

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Posouzení vhodnosti mitochondriálních dat pro odhalování fylogenetických vztahů myxosporeí

Bakalářská práce

Vypracovala: Martina Cinková

Školitel: RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

České Budějovice 2010

Bakalářská diplomová práce

Cinková M., 2010: Posouzení vhodnosti mitochondriálních dat pro odhalování fylogenetických vztahů myxosporeí [Assessment of the mitochondrial data for the phylogenetic relationships of Myxosporea. Bc. Thesis, in Czech] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

16S rDNA was obtained from seven myxozoan species and cnidarian *Polypodium hydriforme*. The phylogenetic analysis supports the close relationships of Myxozoa and Hydrozoa. Mitochondrial marker was found suitable for revealing of phylogenetic relationships of Myxozoa within Cnidaria.

Tato práce byla financována z projektu Grantové agentury ČR (204–09–P519)

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 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.

V Českých Budějovicích dne

.....

Martina Cinková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli Ivanu Fialovi za pomoc, dobré rady a přátelský přístup, rodičům za umožnění studia a všem, kteří mě podporují.

Obsah

1. ÚVOD	5
1.1 Základní charakteristika	5
1.2 Morfologie	5
1.3 Životní cyklus	6
1.3.1 Vývoj myxospor v obratlovcích	7
1.3.2 Vývoj aktinospor v kroužkocích.....	8
1.4 Onemocnění ryb působené myxozoi	9
1.5 Klasifikace	9
1.6 Fylogenetické vztahy.....	10
1.7 Mitochondriální genom.....	11
1.7.1 Živočišný mitochondriální genom	11
1.7.2 Lidský mitochondriální genom	13
1.8 Mitochondriální ribozomální DNA	13
2. CÍLE PRÁCE	15
3. METODY	16
3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	16
3.2 "Long and accurate" PCR (LA-PCR).....	16
3.3 Gelová elektroforéza a izolace z gelu	17
3.4 Klonování.....	18
3.5 Izolace plasmidové DNA	19
3.6 Sekvenování	19
3.7 Fylogenetická analýza	20
4. VÝSLEDKY	21
4.1 Ribosomální DNA data	21
4.2 Protein-kódující DNA data	28
5. DISKUZE.....	29
6. ZÁVĚR	31
7. SEZNAM LITERATURY	32

Přílohy

1. Úvod

1.1. Základní charakteristika

Myxozoa jsou hospodářsky významný kmen endoparazitů bezobratlých a obratlovců. Jejich hostitelé jsou převážně ryby, kterým mohou působit závažná onemocnění. Dalšími hostiteli jsou kroužkovci, hlísti, plazi a obojživelníci. Myxozoa byla nedávno nalezena dokonce i u ptáků (Bartholomew a kol. 2008) a savců (Prunescu a kol. 2007).

Kmen Myxozoa zahrnuje třídu Myxosporea (parazité mořských i sladkovodních ryb a výjimečně plazů a obojživelníků) a třídu Malacosporea (parazité sladkovodních mechovek). Myxosporeí bylo do roku 2006 popsáno více než 2 180 druhů a malacosporeí byly popsány čtyři druhy (Lom a Dyková 2006).

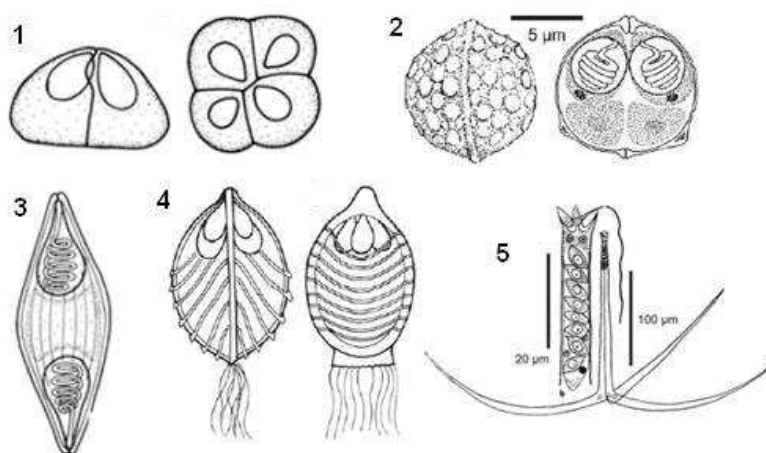
Třída Myxosporea obsahuje dva řády Bivalvulida (spory mají 2 chlopně a většinou 2 pólové váčky) a Multivalvulida (spory mají více než 2 chlopně a obvykle více než 2 pólové váčky). Životní cyklus myxosporeí zahrnuje dva hostitele – obratlovce a kroužkovce. Myxosporea ve svých hostitelích žijí ve formě plasmodiálních útvarů, ve kterých vznikají v konečné fázi životního cyklu typické myxospory (v rybě) nebo aktinospory (v kroužkovci).

1.2. Morfologie

Myxosporea mají charakteristické spory, které jsou složené z několika buněk přeměněných na dvě až sedm chlopní, sporoplasmu a několik pólových váček podobných nematocystám u žahavců. Povrch spory je buď hladký nebo rýhovaný (Obr. 1). Mohou být protáhlé do různých tvarů a mít přívěsek vylučující sekret nebo mohou být obaleny ve slizovém pouzdru, které jim umožní dostat se z prvního hostitele do vody, kde najdou dalšího hostitele. Jejich velikost se pohybuje od 10 do 20 μm . Pólové váčky obsahují pólová vlákna stočená podél váčku. Tato vlákna mají po vymrštění přichycovací funkci, kterou myxosporea využívají při přechodu mezi hostiteli. Uspořádání pólových vláken je také důležité ve druhové klasifikaci. Myxosporea mají buňky, které stejně jako živočišné buňky obsahují cytoplasmatické organely, volné ribosomy a zásobní materiál jako je tuk a glykogen. Mitochondrie mají trubicovitý, plochý nebo diskovitý tvar. Od typické eukaryotické buňky se Myxosporea liší nepřítomností centrioly a bičíků. Dělicí vřetenko se sbíhá na destičce na

vnitřní jaderné membráně. Vegetativní stádia myxosporeí mají proměnlivý tvar a objem a mohou dosahovat velikosti až několika milimetrů a vytvářet cysty pod povrchem žáber nebo kůže. Je několik typů vegetativních stádií, buď coelozoické (v tělní dutině nebo v dutině orgánu), histozoické, intercelulární (mezi tkáňovými buňkami) nebo intracelulární.

Do třídy Malacosporea patří parazité sladkovodních mechovek. Trofické, proliferativní stádium v dutině mechovek má tvar uzavřeného mnohobuněčného váčku nebo má červovité tělo. Trofické stádium je v hostitelském epitelu skryté (cryptic stage) a vydrží tak až šest týdnů. Spory se tvoří po dokončení meiózy z pre-sporogenních buněk. Spory jsou kulaté a obsahují dvě sporoplasmy s vnitřními buňkami.

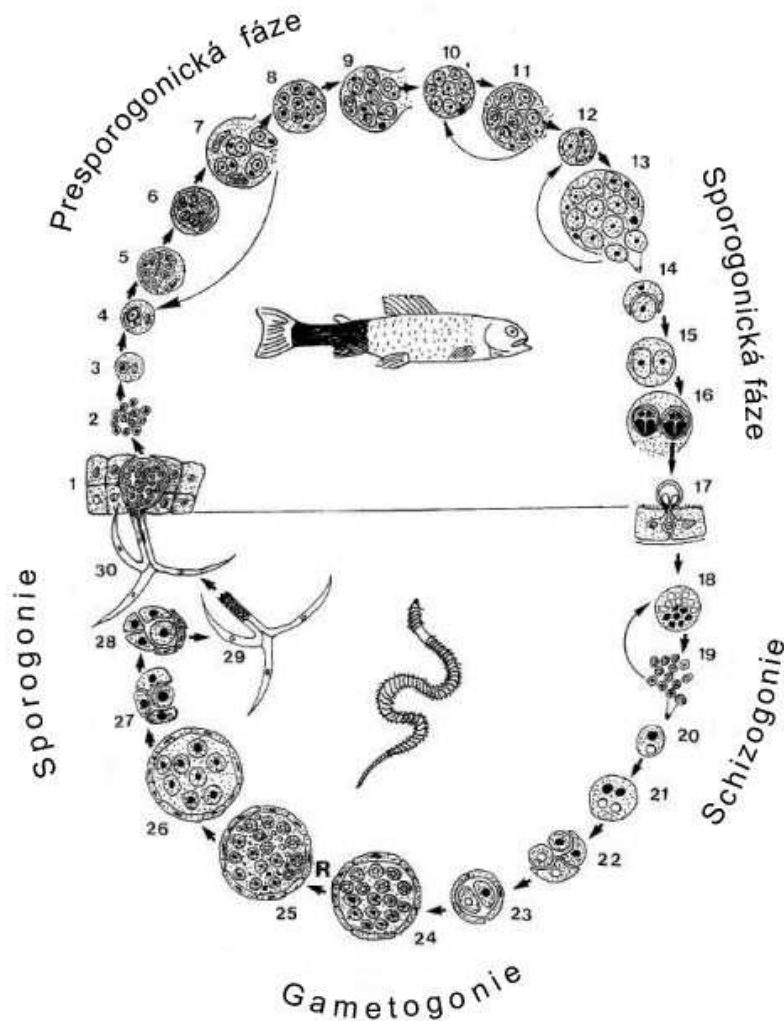


Obr. 1: 1 – 4. Myxospory. 5. Aktinospora. 1. *Kudoa paniformis*. 2. *Sphaerospora elegans*. 3. *Myxidium lieberkuehni*. 4. *Chloromyxum leydigi*. 5. *Triactinomyxon*. (Převzato z Lom a Dyková 2006)

1.3. Životní cyklus

Životní cyklus myxosporeí probíhá ve dvou hostitelích, obratlovcích a kroužkvcích (Obr. 2). Lépe prozkoumaná je myxosporová fáze v obratlovcích, při které vznikají myxospory (Wolf a Markiw 1984). Typickým hostitelem jsou ryby, vzácně obojživelníci a plazi, výjimečně ptáci a savci. V hostiteli aktinosporové fáze (kroužkvcích) probíhá pohlavní proces, jehož výsledkem jsou aktinospory (El-Matbouli a Hoffmann 1998). Myxospory vznikají v malém nebo velkém sporogonálním plasmodiu. Typické stádium

vývoje je „buňka v buňce“, kdy primární buňka produkuje sekundární buňky, které zůstávají uvnitř mateřské buňky.



Obr. 2: Životní cyklus myxozoi založený převážně na životním cyklu *Myxobolus cerebralis*.

1 - 16. Vývoj myxospor v rybím hostiteli. 17 – 30. Vývoj aktinospor v kroužkovecích.

(Převzato z Kent a kol. 2001)

1.3.1. Vývoj myxospor v obratlovcích

Životní cyklus byl poprvé popsán u *Myxobolus cerebralis* (Wolf a Markiw 1984). Aktinospory se dostanou z kroužkoců do vody, kde zůstávají než se náhodně setkají s rybou (mezihostitelem). Pólové váčky při kontaktu s kůží nebo žábami vystřelí pólová vlákna a přichytí se na hostitele. Spory se otevrou a sporoplasmata se dostanou do kůže skrz pokožkové a výstelkové hlenové buňky.

Ve presporogonické / extrasporogonické fázi se během prvních 60 minut spora dostává do hostitele a intercelulárně se přesouvá do žaberního epitelu. Potom se sporoplasma rozpadne a každá buňka pronikne do žaber hostitele, kde produkuje sekundární buňky. Ty rychle proliferují pomocí mitózy. Jádra hostitelských buněk jsou stlačená mezi parazitické a hostitelské buňky - plasmalema (Daniels a kol. 1976; El-Matbouli a kol. 1995). Když jsou sekundární buňky namnožené, začnou produkovat nové buněčné dvojice (cell-doublers). Ty způsobí prasknutí membrány primární buňky a dostanou se do hostitelské cytoplasmy. Když jsou volné, prorazí plasmalemu a dostanou se do extracelulárního prostoru. Odtud projdou okolními epitelálními buňkami hlouběji do kožní a podkožní vrstvy a vnikají do nových hostitelských buněk, kde probíhá stejný cyklus. Už po krátké době můžeme najít buněčné dvojice intracelulárně v podkoží hostitele. Přibližně po čtyřech dnech se buňky u *Myxobolus cerebralis* přesouvají do nervové tkáně, kde proliferace pokračuje. Po 6 až 14 dnech můžeme najít mnoho parazitických stádií v míše a po 16 – 24 dnech v mozku.

Ve sporogonické fázi primární buňky rostou, dělí se a produkuje velké množství vnitřních jader. Obalené buňky v plasmodiu se rozpadnou a každá z nich buď opakuje cyklus produkující velké množství plasmodií nebo se spojí s jinou buňkou (El-Matbouli a kol. 1995). Myxosporea jsou nakonec uvolněna z hostitele a infikují kroužkovce.

1.3.2. Vývoj aktinospor v kroužkovicích

Vývoj myxosporeí v kroužkovicích se může rozdělit na tři fáze – schizogonie, gametogonie a sporogonie (El-Matbouli a Hoffmann 1998).

Schizogonie – spory se přichytí ke střevní dutině pomocí pólových vláken. Poté se otevrou a dvojjaderné sporoplasmy se dostanou do střevního epitelu. Ty nemají pólová vlákna, a proto jsou pro hostitele neodhalitelné. Později se obě jádra sporoplasmat začnou dělit a produkovat mnohojaderné buňky. Některé se dělí a tvoří další mnohojaderné a jednojaderné buňky, jiné splynou s dvojjaderným stádiem.

Gametogonie – dvojjaderné buňky se dělí na stadia se čtyřmi jádry. Dvě jsou somatické a dvě generativní, které se dále dělí na α a β . Tři mitotická dělení generativních buněk vytvoří 16 diploidních gametocyst, které po meiotickém dělení vytváří 16 haploidních gametocyst a 16 polárních tělísek. Každá gametocysta α se spojí s gametocystou β a produkuje osm zygot.

Sporogonie – na konci gametogonie je osm zygot v každé pansporocystě obklopeno osmi somatickými buňkami. Každá zygota se dvakrát mitoticky rozdělí, takže další jádro

obsahuje čtyři buňky. Tři jsou na okraji a dělí se na tři váčkové a tři valvogenické buňky. Čtvrtá buňka je ve středu a ta se dělí mnohonásobně mitotickým dělením na sporoplasmu s vnitřními buňkami. Buňky rozšíří zavínutou membránu, která se nakonec stočí do váčků a vytváří tím tři výběžky triactinomyxonových spor. Konečné stádium obsahuje osm aktinospor.

Celý tento cyklus trvá přibližně 90 dní. Aktinospory se uvolní a můžou žít bez hostitele až dva týdny (Xiao a Dessler 2000).

1.4. Onemocnění ryb působené myxozoi

Myxozoa na svého hostitele málokdy působí patogenně nebo dokonce letálně. Přesto je zde několik ekonomicky významných druhů, které vyvolávají onemocnění hospodářských ryb. *Myxobolus cerebralis* způsobuje významné ztráty chovných lososovitých ryb. Ničí chrupavku a přilehlé tkáně juvenilních ryb. Silné infekce často vedou ke smrti nebo doživotním deformacím kostry. *M. cerebralis* je zodpovědný za velké poklesy divokých pstruhů v USA (Hedrick a kol. 1998). *Ceratomyxa shasta* infikuje zažívací trakt lososovitých ryb hlavně v Severní Americe (Kent a kol. 1994). Lososovité ryby mohou být napadené také druhem *Tetracapsuloides bryosalmonae*, který způsobuje onemocnění nazvané proliferativní onemocnění ledvin (Canning a kol. 1999). *Sparus aurata* ze Středozevního moře je ohrožován *Enteromyxem leei*, střevním parazitem, který způsobuje chronické střevní katary, které často zaviní smrt infikovaných jedinců (Diamant a kol. 1994). *Sphaerospora testicularis* a *S. dicentrarchi* jsou parazité mořských ryb *Dicentrarchus labrax*, u kterých způsobují vysokou mortalitu juvenilních ryb (Sitja-Bobadilla a Alvarez-Pellitero 1993). Svaly infikující *Kudoa thyrsites* není zodpovědná za smrt ryb, ale může způsobit ztrátu tržní hodnoty ryb (Moran a kol. 1999).

1.5. Klasifikace

Současná klasifikace je založena na morfologii spor (počtu a uspořádání chlopní a pólových váčků). Tato taxonomie má však nejasné hranice mezi druhy jako je *Leptotheca* a *Ceratomyxa* nebo *Myxidium* a *Zschokkella*. Neodráží životní cyklus se střídáním hostitelů,

morfologii aktinospor v konečném bezobratlém hostiteli ani fylogenetické vztahy, které odhalila analýza malé ribosomální podjednotky DNA (SSU rDNA).

Zkrácená klasifikace kmene Myxozoa (Lom a Dyková 1992):

Kmen Myxozoa

Třída Myxosporea

Řád Bivalvulida (mořští a sladkovodní, mají 2 chlopně)

Podřád Variisporina (mořští a sladkovodní)

Ceratomyxa, Chloromyxum, Hoferellus, Myxidium, Myxobilatus, Ortholinea, Parvicapsula, Polysporoplasma, Sinuolinea, Sphaerospora, Zschokkella, Enteromyxum, Leptotheca

Podřád Platysporina (mořští a sladkovodní)

Myxobolus, Henneguya a Thelohanellus

Podřád Sphaeromyxina (mořští, páskovitá pólová vlákna na protilehlých koncích spory)

Sphaeromyxa

Řád Multivalvulida (mořští, mají více než 2 chlopně)

Hexacapsula, Kudoa, Trilospora a Unicapsula

Třída Malacosporea (sladkovodní parazité mechovek)

Řád Malacovalvulida

Buddenbrockia, Tetracapsula (4 pólové váčky)

1.6. Fylogenetické vztahy

Gen pro RNA malé ribosomální podjednotky (SSU rRNA) je široce využíván pro odhalování fylogenetických vztahů v taxonomii. Molekulární analýzy využívající SSU rRNA genové sekvence myxosporeí ukazují, že klasifikace založená převážně na struktuře a tvaru myxosporeí není shodná s fylogenetickými vztahy (Smothers a kol. 1994). Fylogenetická analýza odhalila oddělení sladkovodních a mořských myxosporeí do dvou hlavních větví (Kent a kol. 2001). Vnitřní topologie mořských a sladkovodních větví odpovídá různým charakteristikám jako je morfologie spor nebo místo infekce.

Délka genových sekvencí SSU rDNA není u eukaryotických organismů stálá a může být různě dlouhá (Milyutina a kol. 2001). Délka SSU rDNA se liší i v rámci myxosporeí. Většina myxosporeí parazitujících u mořských druhů má kratší sekvenci SSU rDNA než *Myxosporea* parazitující u sladkovodních druhů. Délka sekvencí SSU rDNA u mořského druhu *Chloromyxum leydigi* je 1866 nukleotidů (Fiala 2006). Tato délka odpovídá fylogenetickému umístění na bázi sladkovodní skupiny.

Myxozoa nebyla původně řazena mezi Metazoa, i když mají mnohobuněčné spory a nematocystům podobné pólové váčky. Až analýzou sekvence SSU rDNA se potvrdilo, že nepatří mezi protista, kam byla po více než jedno století řazena (Smothers a kol. 1994). Nejednotné analýzy sekvencí SSU rDNA u myxozoi naznačovaly příbuznost se žahavci (Siddall a kol. 1995) nebo bilatériemi (Hanelt a kol. 1996). Příbuznost k žahavcům podporuje fakt, že Myxozoa obsahují pólové váčky podobné žahavým organelám žahavců, kteří je využívají na přichycení k hostiteli. Pólové váčky se ovšem liší v nepřítomnosti chemo- nebo mechanosenzorů (Westfall 2004). Objev *Buddenbrockia plumatellae*, až několik milimetrů dlouhého červovitého organismu, jako druhu patřícího do skupiny Myxozoa (Monteiro a kol. 2001) naznačuje možnou příbuznost myxozoi s bilatériemi. Nicméně multigenová fylogenetická analýza *B. plumatellae* potvrdila žahavce jako nejbližší příbuzné myxozoi (Jimenez-Guri 2007).

1.7. Mitochondriální genom

1.7.1. Živočišný mitochondriální genom

Živočišný mitochondriální genom je malý extrachromosomální genom o velikosti okolo 16 kb. Až na několik výjimek všechny zvířecí mitochondriální genomy obsahují 37 genů: 2 geny pro rRNA, 13 pro proteiny a 22 pro tRNA. Produkty těchto genů spolu s RNA a proteiny přenesenými z cytoplasmy jsou obsaženy v mitochondrii s jejím vlastním systémem pro DNA replikaci, transkripci a mRNA proces a translaci proteinů. Studie těchto genů a genomů a jejich funkčnost v mitochondriálním systému (mitochondriální genomika) může sloužit jako model pro genomovou evoluci. Dále se srovnání uspořádání mitochondriálních genů stalo velmi efektivním způsobem pro odvozování dávných evolučních vztahů. Před deseti lety bylo kompletní uspořádání mitochondriálního genu známo

u 58 druhů strunatců a 29 dalších druhů (Boore 1999). V současnosti je v genové bance publikováno téměř dva tisíce mitochondriálních genů metazoí, z toho 35 tvoří genomy žahavců.

Mitochondrie hrají hlavní roli v metabolismu a apoptóze. Jsou místem, kde probíhá oxidativní fosforylace nezbytná pro produkci ATP a rozmanitých biochemických funkcí. Uvnitř těchto organel je genom oddělený od jaderného chromatinu a označený jako mitochondriální DNA (mtDNA), která je často používaná pro studium molekulární fylogenetiky (Moritz a kol. 1987, Suarez-Diaz a kol. 2008). Mnohobuněční živočichové mají téměř vždy uzavřenou cirkulární molekulu, pouze u Cubozoa, Scyphozoa a Hydrozoa ze třídy žahavců byly nalezeny lineární mtDNA molekuly (Bridge a kol. 1992).

Ačkoli je u živočichů znám většinou malý mitochondriální genom, byl nalezen i mnohem větší, který obsahoval spíše duplikace částí mtDNA než změněný genový obsah (Boyce a kol. 1989, Fuller a kol. 1993). Z historického hlediska mají tyto geny určitou specifičnost pro živočišnou mtDNA.

Abnormální mitochondriální genom je popsán u hlístic (Keddie a kol. 1998, Okimoto a kol. 1992), kterým chybí podjednotka 8 ATP syntetázy (u živočišné mtDNA označovaná jako A8), u mlžů, kterým chybí A8 a obsahují extra tRNA (Hoffmann, Boore a Brown 1992) a u žahavců, kteří ztratili téměř všechny tRNA geny a získali jeden nebo dva další geny dosud nenalezené v jiných mtDNA (Beagley a kol. 1998).

Všech 37 genů nalezených v živočišné mtDNA bylo homologních v mtDNA rostlin, hub a prvoků. Je zde také většinou velká jednotná nekódující oblast, která je u několika živočichů známá obsahem řídicích částí pro replikaci a transkripci (Shadel a Clayton 1997). Zda jsou tyto řídicí oblasti homologní mezi vzdáleně příbuznými živočichy nebo vznikly jinak z různých nekódujících sekvencí nezávislých na odděleném evolučním vývoji je nejisté. Je pozoruhodné, že většina mtDNA má také jiné, menší nekódující oblasti, které také mohou obsahovat kontrolní elementy.

V některých mtDNA jsou všechny geny transkribovány z jednoho řetězce, zatímco v ostatních genech je rozdělen mezi dva řetězce. I když je známo, že živočišné mitochondriální genomy se vyvíjejí rychle, jejich genové uspořádání často zůstává nezměněné i po dlouhé evoluční období. Například uspořádání genů člověka (Arnason a kol. 1996) a pstruha (Zardoya a kol. 1995) je stejné. Až na několik výjimek je genové uspořádání uvnitř hlavní skupiny relativně stálé. Různorodost mezi nimi a srovnání tohoto genového uspořádání má velký význam pro řešení fylogeneze některých největších skupin metazoí. Srovnání genového uspořádání v mtDNA poskytlo přesvědčivou rekonstrukci fylogeneze v několika

případech, kde všechna ostatní data přinášela nejisté výsledky. Jedná se o vztahy mezi hlavní skupinou ostnokožců (Smith a kol. 1993) a členovců (Boore a kol. 1995).

1.7.2. Lidský mitochondriální genom

Nejlépe prozkoumaným mitochondriálním genomem je genom člověka. Lidská mtDNA je cirkulární dvouřetězcová molekula dlouhá 16 569 bp (jiné sekvence savčích mitochondriálních genomů mají podobnou délku). Kóduje 2 rRNA, 22 tRNA a 13 polypeptidů, ze kterých sedm je složeno z komplexu I (NADH dehydrogenáza), tři jsou složeny z komplexu IV (cytochrom c oxidáza), dva jsou podjednotky komplexu V (ATP syntáza) a jeden je cytochrom b (podjednotka komplexu III) (Anderson a kol. 1981).

Mitochondriální geny nemají introny a mezigenové sekvence chybí nebo jsou limitovány na několik bazí. Některé geny se překrývají a v některých případech terminační kodony nejsou kódovány, ale jsou vytvořeny postranskripčně polyadenylací (Ojala a kol. 1981). Mitochondriální DNA je úplně závislá na jaderném kódování proteinů pro jejich údržbu a transkripci. Ve skutečnosti mitochondriální proteom obsahuje odhadem 1 500 polypeptidů.

Dědičnost mtDNA je téměř výhradně mateřská. Mitochondriální DNA je přítomná v jedné z několika tisíc kopií na buňku (Takamatsu a kol. 2002) a je uzavřena do mitochondrií po 1-11 kopiích (Cavelier a kol. 2000). Většina informací je zakódována v těžkých (na purin bohatých) řetězcích (2 rRNA, 14 tRNA a 12 polypeptidů). Lehké řetězce (bohaté na pyrimidin) obsahují genetickou informaci pouze pro jeden polypeptid a osm tRNA.

1.8. Mitochondriální ribozomální DNA

Mitochondriální ribozomální DNA jsou strukturální protein-nekódující geny. Přepisují se na RNA, která je součástí malé či velké ribozomální podjednotky RNA (12S respektive 16S rRNA). Mají zachovanou sekundární strukturu a jsou spojeny s proteiny do mitochondriálního ribozomu. Tyto geny mohou být využity pro odhalování fylogenetických vztahů různých druhů (např. Bybee a kol. 2008, De Rojas a kol. 2001).

Mitochondriální ribozom (mitoribozom) je v eukaryotických buňkách zodpovědný za biosyntézu proteinových složek. Obecně se předpokládá, že mitoribozomy jsou strukturně

a funkčně podobné více bakteriálním ribozomům než eukaryotickým cytoplasmatickým ribozomům. Jako všechny ribozomy, tak i mitoribozom o velikosti 55S (molekulární hmota 2,71 MDa) je složen ze dvou podjednotek nestejně velikosti: malé (28S) a velké (39S) (O'Brien 1971). RNA a složení proteinů se významně liší od bakteriálního ribozomu. 28S malá podjednotka obsahuje 12S rRNA (950 nukleotidů) a 29 proteinů naruždí od bakteriální 30S malé podjednotky, která je složena z 16S rRNA (1542 nukleotidů) a 20 proteinů. 39S velká podjednotka mitoribozomů obsahuje 16S rRNA (1560 nukleotidů) a 48 proteinů (Koc a kol. 2001), zatímco bakteriální velká podjednotka 50S je složena ze dvou rRNA molekul (5S (120 nukleotidů) a 23S (2904 nukleotidů)) a 33 proteinů. Srovnání bakteriálního, eukaryotického a mitochondriálního ribozomu je uvedeno v tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Srovnání ribozomů.

	Bakteriální (70S)	Eukaryotická (80S)	Mitochondriální (55S)
Velká podjednotka	50S	60S	39S
rRNA	23S (2904 nt)	28S (4700 nt)	16S (1560 nt)
	5S (120 nt)	5S (120 nt)	
		5.8S (160 nt)	
Proteiny	33	~49	48
Malá podjednotka			
Malá podjednotka	30S	40S	28S
rRNA	16S (1542 nt)	18S (1900 nt)	12S (950 nt)
Proteiny	20	~33	29

2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je:

- 1) Amplifikovat a sekvenovat mitochondriální geny u vybraných druhů myxosporeí.
- 2) Zkonstruovat fylogenetické stromy na základě získaných dat.
- 3) Posoudit vhodnost studovaných genů pro účely molekulární taxonomie myxosporeí.

3. Metody

3.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Reakční směs na PCR se připravila smícháním 2,5 µl 10x PCR pufru, 2 µl nukleotidů (250 µmol), 1 µl forward primeru (10 pmol), 1 µl revers primeru (10 pmol), 1 µl Taq purple polymerázy (1 jednotka), 1 µl DNA a doplněním deionizovanou vodou na celkový reakční objem 25 µl. Vždy se dělala i negativní kontrola (reakční směs bez DNA) pro odhalení případné kontaminace. Používané primery jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2).

Následovala amplifikace v termocycleru (Biometra). První krok amplifikace byl nastaven na 94 °C na 60 s. Po 30 cyklech zahrnujících denaturaci při teplotě 94 °C po dobu 30 s, nasedání primerů při teplotě 48 °C po dobu 60 s a syntézu nového vlákna probíhající při teplotě 72 °C po dobu 45 s následovala inkubace při 72 °C po dobu 10 min. Druhá používaná amplifikace byla nastavena na 94 °C na 2 min, 6 cyklů 94 °C / 45 s; 45 °C / 50 s; 72 °C / 1 min, dále následovalo 30 cyklů 94 °C / 45 s; 50 °C / 1 min; 72 °C / 1 min a závěrečná inkubace byla při 72 °C po dobu 10 min.

3.2. „Long and accurate“ PCR (LA-PCR)

Pro přípravu jedné LA-PCR reakce se smíchalo 25 µl 2x PCR pufru, 8 µl nukleotidů (1 mmol), 1 µl forward primeru (10 pmol), 1 µl revers primeru (10 pmol), 0,25 µl LA Taq polymerázy (2,5 jednotky), 1 µl DNA a doplnilo sterilní vodou na celkový objem 50 µl. Používané primery jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 2). Amplifikace v termocycleru byla následovná: 94 °C/60 s (94 °C/30 s; 55 °C/45 s; 72 °C/15 min) 30 cyklů; 72 °C/15 min.

Tabulka 2: Použité primery.

Název	Cílový gen	Sekvence 5' → 3'
HCO2198	COX1	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
LCO1490	COX1	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
cox2R1	COX2	CTCCRCATATTTTCNGARCATTGNCC
cox2F1	COX2	AAGCWAATWGGNCATCARTGRTATTG
cobR876	COB	GCRTAWGCRAAWARRAARTAYCAYTCWGG
cobF424	COB	GGWTAYGTWYTWCCWTGRGGWCARAT
16SKudoa-F	16S rDNA	CTTAATTATCTGTCAATTTTATTG
16SKudoa-R	16S rDNA	CTTTGTTACAGTCAAATACTGC
F-COI-myxospec	COX1	GGWGGTTTTGGTAATTGRTTTGTA
R-COI-myxospec	COX1	GTAGTATTAATAATTWCGATCTGT
16S-L	16S rDNA	GACTGTTTACCAAAAACATA
16S-H	16S rDNA	CATAATTCAACATCGAGG
16S-Kud-in1F	16S rDNA	TACTGCCAAAGAGTTCTACTGG
16S-Kud-in1R	16S rDNA	TAGCAGAAGAAAATTCTCTTGCCC
16S-Kud-in2F	16S rDNA	TGATGACCAGGGAAGTATAAACG
16S-Kud-in2R	16S rDNA	TCTTGCCCCATTATCCCTTAAC
16Smt-F	16S rDNA	GTTAAGGGATAATGGGGCAAGA
16Smt-R	16S rDNA	CCAGTAGAACTCTTTGGCAGTA

3.3. Gelová elektroforéza a izolace z gelu

K ověření správného průběhu PCR i LA-PCR se používala gelová elektroforéza s 1% agarózovým gelem. Navážilo se 0,55 g agarózy a rozpustilo v 55 ml 0,5x TAE pufru, přivedlo do varu v mikrovlnné troubě a poté ochladilo na cca 45 °C. Po přidání 3 µl ethidium bromidu a následném promíchání se takto udělaný gel nalil do připravené vaničky s hřebínky a nechal ztuhnout (při pokojové teplotě přibližně 30 minut). Po ztuhnutí gelu se do vzniklých žlábků nanesly vzorky z PCR a do prvního žlábků se dalo 5 µl 100 bázového markeru. Elektroforéza probíhala při napětí 70 V po dobu minimálně 30 minut. Poté se gel prohlédl pod UV světlem, vyfotil a vyřízly se proužky gelu obsahující PCR produkty ve správné velikosti.

PCR produkt byl izolován pomocí kitu JET quick Gel Extraction Kit (Genomed). K vyříznutému proužku gelu s PCR produktem bylo přidáno 300 µl roztoku L1 a nechalo se inkubovat při teplotě 50 °C. Po patnácti minutách se roztok přelil do připravené kolonky a centrifugoval 1 minutu při maximálních otáčkách. Slila se proteklá tekutina, přidalo se

500 µl pufr L2 a po pěti minutách stání při pokojové teplotě se dvakrát zcentrifugovalo při maximálních otáčkách 1 minutu. Kolonka se přemístila do 1,5 ml mikrozkušavky a přímo na membránu se přidalo 50 µl sterilní vody. Nechala se inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě a zcentrifugovala 2 minuty při maximálních otáčkách. Promytý PCR produkt se uchovával při teplotě – 20 °C.

Izolace LA-PCR produktu byla prováděna pomocí kitu QIAEX II Gel Extraction Kit (150) (Qiagen) podle manuálu. Vyříznuté bendy z gelu se daly do mikrozkušavky a přidalo se 300 µl pufru QX 1, 200 µl H₂O a 10 µl QIAEX II. Po 10ti minutové inkubaci při 50 °C se vzorek 30 s vortexoval při maximálních otáčkách a odpipetoval se supernatant. Pelet se promyl 500 µl pufru QX 1 a centrifugoval 30 s při maximálních otáčkách. Dvakrát se promyl 500 µl pufru PE, vždy se odpipetoval supernatant a centrifugoval 30 s při maximálních otáčkách. Pelet se nechal schnout při pokojové teplotě do té doby, než zbělal (10 – 15 min), přidalo se 20 µl vody a jemně propipetovalo. Poté následovala inkubace 5 min při 50 °C a centrifugace 30 s. Do nové mikrozkušavky se odpipetoval supernatant a tím se získala přečištěná DNA.

3.4. Klonování

Klonování se skládá z několika částí: ligace, transformace kompetentních buněk, kontrolní PCR a namnožení plasmidu.

Ligace se prováděla pomocí kitu Qiagen PCR Cloning Kit (Qiagen). Ligační reakční směs se připravila smícháním 0,5 µl klonovacího vektoru, 2,5 µl ligačního master mixu a 2 µl PCR produktu. Takto připravená směs se inkubovala dvě hodiny při teplotě 14 °C.

Ligační směs se smíchala s 65 – 100 µl kompetentních buněk (E. coli kmen XL-1), opatrně se promíchala a inkubovala se 10 minut na ledu. Po 30ti sekundovém teplotním šoku ve vodní lázni o teplotě 42 °C se směs dala opět inkubovat na led na 2 minuty. Přidalo se 200 µl SOC media a dalo se třepat ve vodorovné poloze na 45 minut při teplotě 37 °C. Na připravené petriho misky s bakteriální půdou (200 ml H₂O, 3 g bactoagar, 2 g bacto-tryptone, 1 g bacto-yeast extract, 2 g NaCl) se rozetřelo 40 µl X-galu a transformovaná směs a misky se inkubovaly přes noc v termostatu při teplotě 37 °C.

Po transformaci buněk následovala kontrolní PCR. Z narostlých kolonií se pipetovací špičkou vypíchlá bílá kolonie a rozmíchala ve 30 µl sterilní vody. Z této buněčné suspenze se

připravila PCR reakční směs s polovičním objemem než pro standardní PCR, tedy s objemy 1,25 µl 10 x PCR pufru, 1 µl nukleotidů, 0,5 µl M13 forward primeru, 0,5 µl M13 revers primeru, 0,5 µl Taq purple polymerázy a doplněno deionizovanou vodou na celkový objem 11 µl. Do takto připravené směsi se přidaly 2 µl buněčné suspenze a zbytek se uchovával v lednici pro namnožení plasmidu. Dále následovala amplifikace při těchto teplotách a časech: 95 °C / 10 min (95 °C / 30 s; 50 °C / 50 s; 72 °C / 45 s;) 21x; 72 °C/5 min. Po vizualizaci pomocí agarózové elektroforézy se u naamplifikovaných vzorků pokračovalo s namnožením.

Do zkumavky se 3 ml LB média (100 ml H₂O, 1 g bactotryptone, 0,5 g bacto-yeast extract, 1 g NaCl) se přidalo 12 µl ampicilinu a zbylá bakteriální suspenze. Zkumavky se daly třepat přes noc na 37 °C

3.5. Izolace plasmidové DNA

Izolace plasmidové DNA se prováděla pomocí kitu JET quick Plasmid Miniprep Kit (Genomed). Nejdříve se přelila suspenze bakterií do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifugovala se při maximální rychlosti 1 minutu. Potom se odstranily zbytky média a pelet se resuspendoval ve 250 µl roztoku G1. Aby buňky zlyzovaly, přidalo se 250 µl roztoku G2, jemně promíchalo několikrát převrácením zkumavky a inkubovalo 5 minut při pokojové teplotě. Přidáním 350 µl roztoku G3, promícháním a 10 minutovou centrifugací při maximálních otáčkách došlo k neutralizaci. Pak se supernatant přelil do kolonky, centrifugoval 1 minutu, vylila se proteklá tekutina a přidalo se 500 µl roztoku G4 a po dvou minutových centrifugacích došlo k promytí. Kolonka se přemístila do 1,5 ml mikrozkušavky a přímo na silikonovou membránu kolonky se přidalo 50 µl vody. Vzorek se nechal inkubovat 1 minutu a po 2 minutách centrifugování při maximálních otáčkách jsme získali plasmid, který se uchovával při teplotě – 20 °C.

3.6. Sekvenování

Sekvence probíhala v servisní laboratoři genomiky. DNA byla sekvenována po obou řetězcích pomocí univerzálních primerů M13F a M13R, které nasedají na plasmidovou DNA. Sekvence byla provedena pomocí automatického sekvenátoru ABI PRISM 3130xl.

3.7. Fylogenetická analýza

Sekvenční data ze sekvenátoru byla kompletována v programu SeqMan (DNASTAR). Uspořádání (alignment) bylo sestaveno ze získaných 16S rDNA sekvencí myxozoi a *Polypodium hydriforme* a ze sekvencí uložených v genové bance (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Z genomové databáze NCBI byly z oddělení eukaryotických organelových genomů vyhledány 16S rDNA sekvence zástupců žahavců (Cnidaria) a houbovců (Porifera). Sekvence byly uspořádány v programu MAFFT verze 6.626b (Kato a kol. 2002) metodou E-INS-i.

Fylogenetická analýza byla provedena distanční metodou (LogDet), metodou maximální úspornosti (maximum parsimony MP) a metodou maximální pravděpodobnosti (maximum likelihood ML) v program PAUP* 4.0b10 (Swofford 2001). LogDet analýza a konstrukce stromu pomocí metody MP byla provedena heuristickým vyhledáváním s algoritmem TBR (tree-bisection-reconnection). Poměr transicí ku transverzím byl 1:2. Mezery v alignmentu byly analyzovány jako chybějící data. Pro ML byl určen nejvhodnější model evoluce pomocí LRT (likelihood ratio test) metody v programu Modeltest verze 3.06 (Posada a Crandall 1998). Statistická podpora pro všechny metody byla stanovena bootstrapovou analýzou s tisíci opakováními. Všechny stromy byly zobrazeny programem TreeView 32 (Page 1996). Na úpravu fylogenetických stromů byl použit program Adobe Illustrator 10 CE.

4. Výsledky

4.1. Ribosomální DNA data

Celkem bylo získáno sedm sekvencí 16S rDNA myxozoí (*Auerbachia pulchra*, *Chloromyxum leydigi*, *Kudoa crumena*, *Kudoa inornata*, *Myxidium bergense*, *Sphaerospora dicentrarchi* a *Sphaerospora* sp.) a jedna sekvence druhu *Polypodium hydriforme*.

Částečná sekvence *Kudoa crumena* má délku 414 bazí vymezenou primerem 16S-L a 16S-H. Obsah AT bazí je 70 % (Tabulka 3). Podle této sekvence byly navrženy specifické vnitřní primery 16S-Kudoa-in-1F(R) a 16S-Kudoa-in-2F(R). Po použití těchto primerů byly získány sekvence o velikosti 189 bazí dalších šesti myxosporeí. Po srovnání je zřejmé, že rozdíly v této části jsou velmi malé. Je zde pouze rozdíl u *Sphaerospora dicentrarchi* v pozicích 171 a 196 a *Chloromyxum leydigi* má pouze jeden rozdíl v pozici 306, kde je narozdíl od ostatních myxozoí guanin. Alignment se získanými sekvencemi a vyznačením primerů je znázorněn v příloze (Příloha 1).

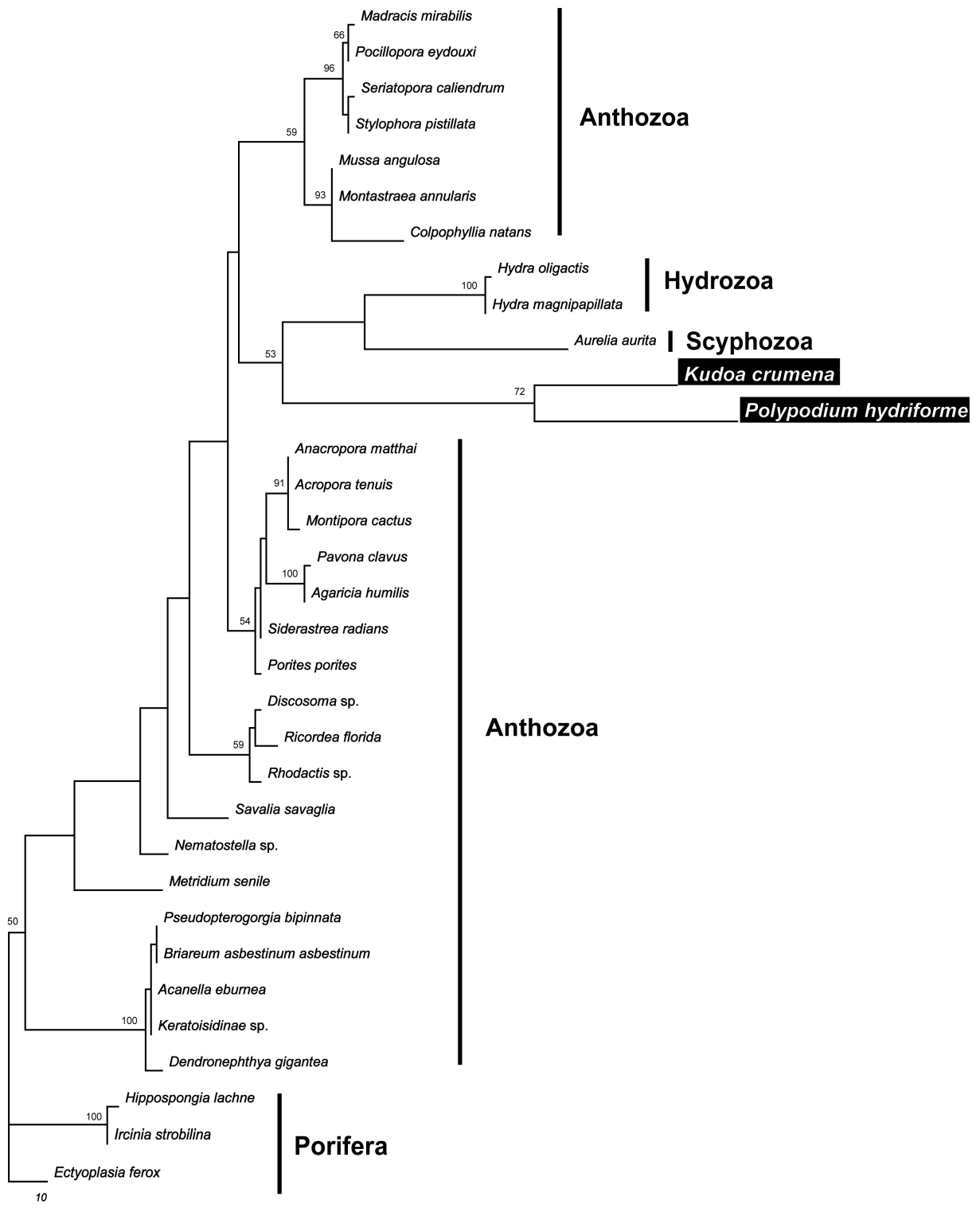
Z Genové banky bylo vybráno 28 sekvencí 16S rDNA žahavců a 3 sekvence zástupců Porifera. Tyto sekvence byly srovnány se dvěma získanými sekvencemi *Kudoa crumena* a *Polypodium hydriforme*. V příloze (Příloha 2) je uveden alignment, ve kterém jsou žahavci rozděleni do tří skupin Anthozoa, Scyphozoa a Hydrozoa. Alignment má délku 802 bazí.

Výsledné stromy jsou znázorněny na obrázcích 3-7. Jejich topologie se u jednotlivých analýz liší. V MP analýze (Obr. 3) se *Kudoa crumena* větví spolu s *Polypodium hydriforme* jako sesterská skupina scyphozoí a hydrozoí. Blízká příbuznost *K. crumena* a *P. hydriforme* je podpořena 72 % bootstrapem. Vztah k hydrozoím a scyphozoím je podpořen nízkým bootstrapem 53 %. V této analýze se skupina Hydrozoa, Scyphozoa, *K. crumena* a *P. hydriforme* větví v rámci anthozoí. Tato pozice ovšem nemá podporu bootstrapu vyšší než 50 %. Nízká hodnota bootstrapů se promítá v konsenzuálním stromu, který se vyznačuje polytomickým větvením (Obr. 4). Rovněž ML analýza (Obr. 5) odhalila blízkou příbuznost *K. crumena* a *P. hydriforme* s nízkou podporou bootstrapu. Tyto druhy se větví v rámci skupiny Anthozoa a jsou fylogeneticky vzdálené od skupiny Hydrozoa a Scyphozoa. V obou analýzách mají *K. crumena* a *P. hydriforme* dlouhé větve. Byla provedena distanční metoda s algoritmem LogDet (Obr. 6), která může odstranit artificiální vliv přetahování dlouhých větví. V této analýze se *K. crumena* větví sestersky ke skupině Hydrozoa a *P. hydriforme* v rámci skupiny Anthozoa. Bootstrapové hodnoty pro podporu tohoto větvení jsou velmi

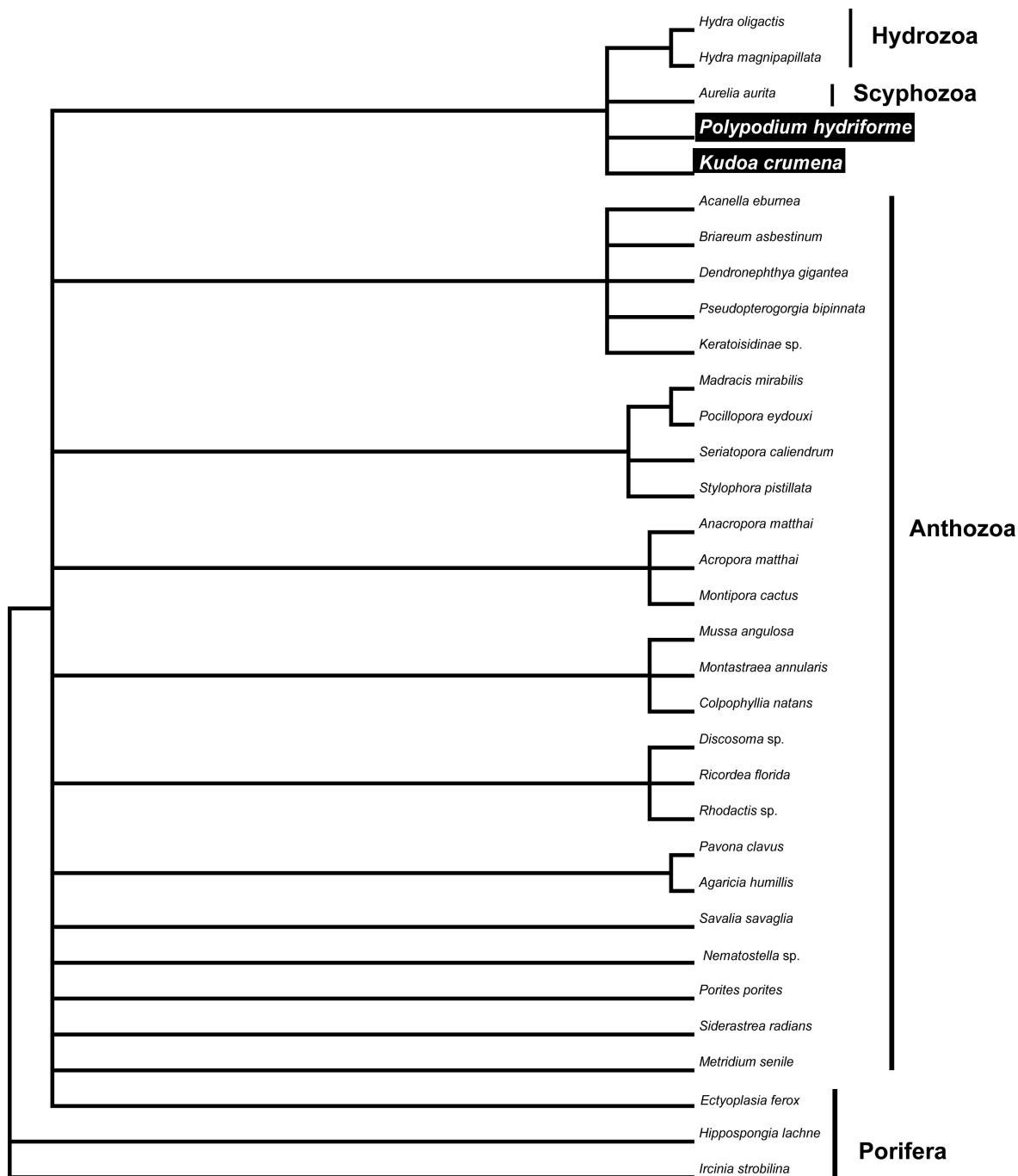
nízké (pod 50 %). Dodatečná analýza ML (Obr. 7) s vyloučením druhu *P. hydriforme* zařazuje *K. crumena* do blízkosti hydrozoí stejně jako v analýze LogDet.

Tabulka 3: Délka sekvencí a AT obsah žahavců, *K. crumena*, *P. hydriforme* a houbovců.

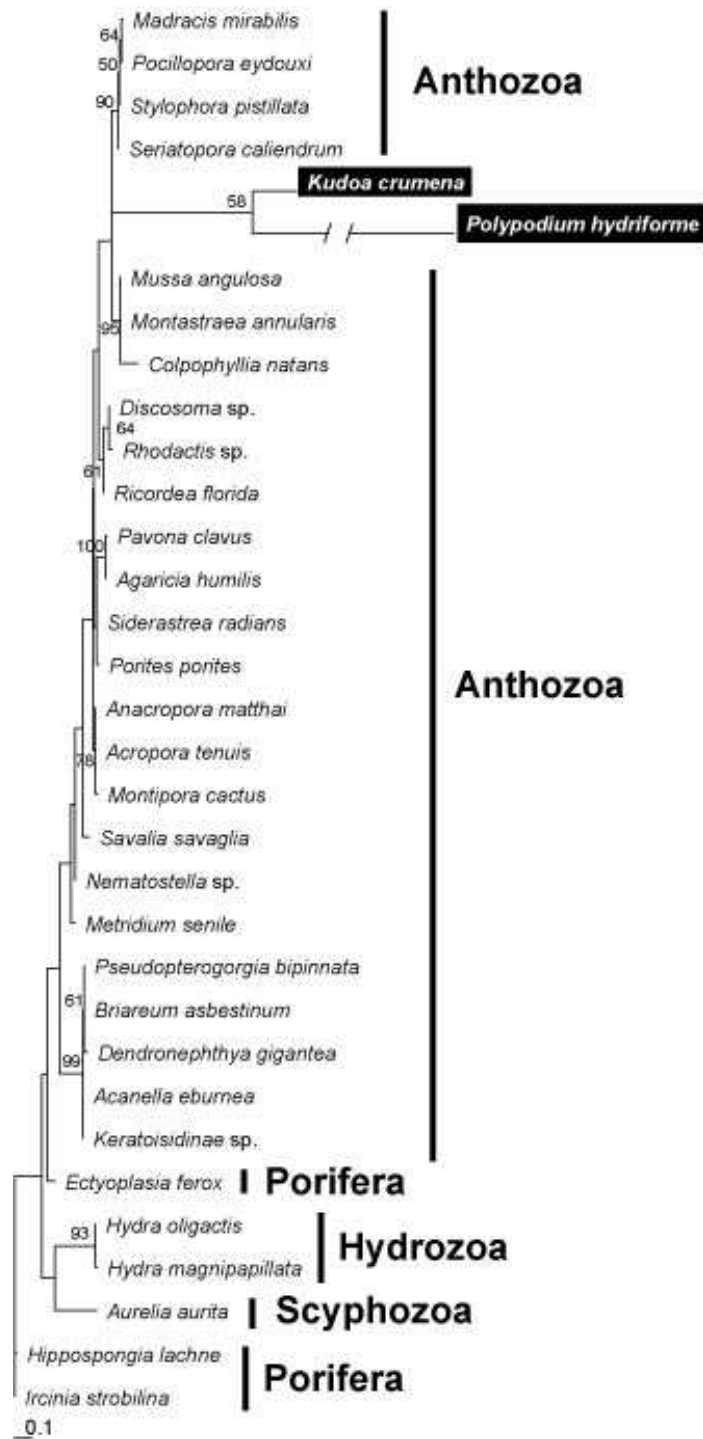
Druh	Délka sekvence (b)	AT obsah (%)
<i>Aurelia aurita</i>	569	63
<i>Savalia savaglia</i>	695	49
<i>Discosoma</i> sp.	701	60
<i>Rhodactis</i> sp.	701	60
<i>Ricordea florida</i>	735	61
<i>Nematostella</i> sp.	602	57
<i>Metridium senile</i>	680	57
<i>Pavona clavus</i>	676	60
<i>Agaricia humillis</i>	676	60
<i>Siderastrea radians</i>	717	61
<i>Porites porites</i>	703	62
<i>Mussa angulosa</i>	509	65
<i>Colpophyllia natans</i>	534	63
<i>Montastraea annularis</i>	534	64
<i>Anacropora matthai</i>	675	61
<i>Montipora cactus</i>	675	62
<i>Acropora tenuis</i>	676	61
<i>Madracis mirabilis</i>	550	67
<i>Seriatopora caliendrum</i>	551	67
<i>Stylophora pistillata</i>	552	68
<i>Pocillopora eydouxi</i>	551	68
<i>Acanella eburnea</i>	649	59
<i>Keratoisidinae</i> sp.	648	59
<i>Pseudopterogorgia bipinnata</i>	631	58
<i>Dendronephthya gigantea</i>	631	59
<i>Briareum asbestinum</i>	645	59
<i>Hydra oligactis</i>	559	75
<i>Hydra magnipapillata</i>	556	76
<i>Kudoa crumena</i>	414	70
<i>Polypodium hydriforme</i>	383	62
<i>Hippospongia lachne</i>	563	61
<i>Iricina strobilina</i>	563	61
<i>Ectyoplastia ferox</i>	691	67



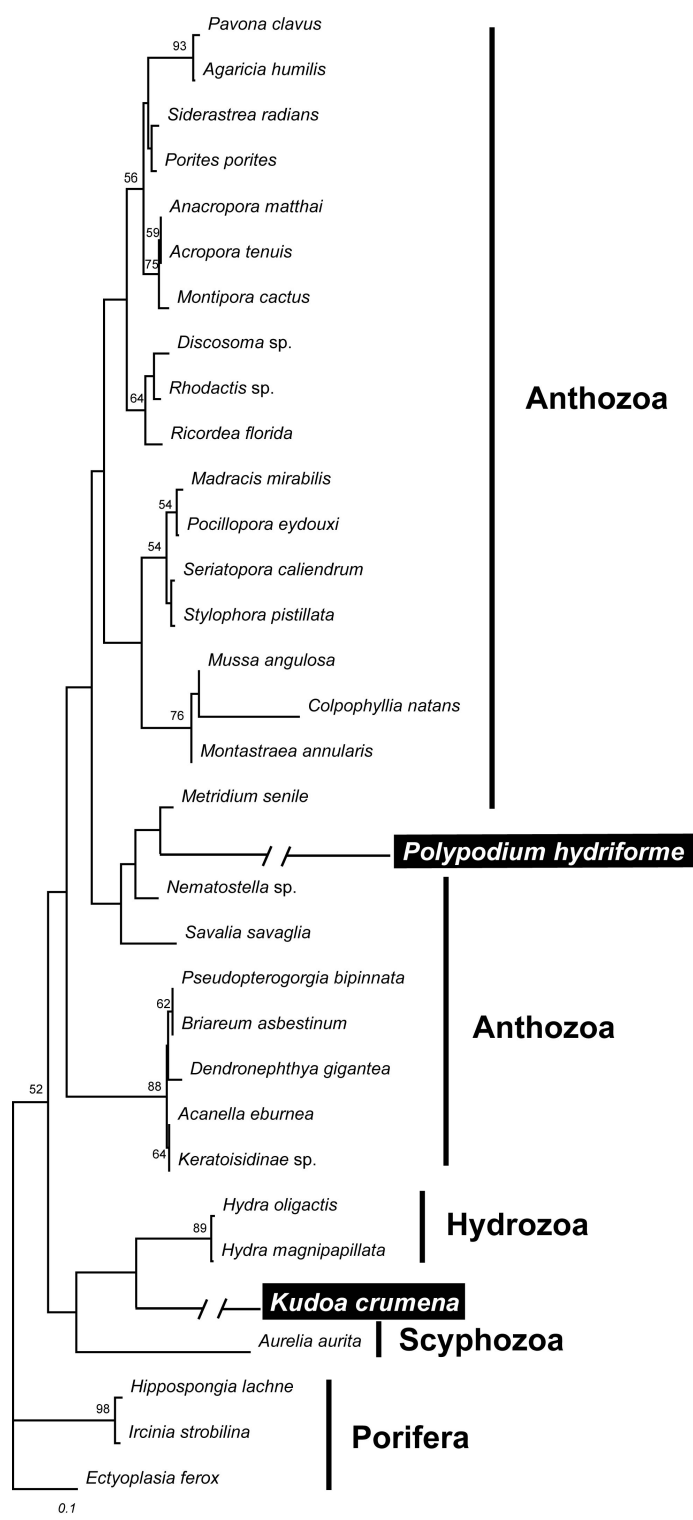
Obr. 3: Fylogenetické vztahy žahavců odvozené metodou maximální parsimonie. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapu vyšší než 50 %. Měřítka délky větví je uvedeno pod stromem. Porifera byla stanovena jako outgroup.



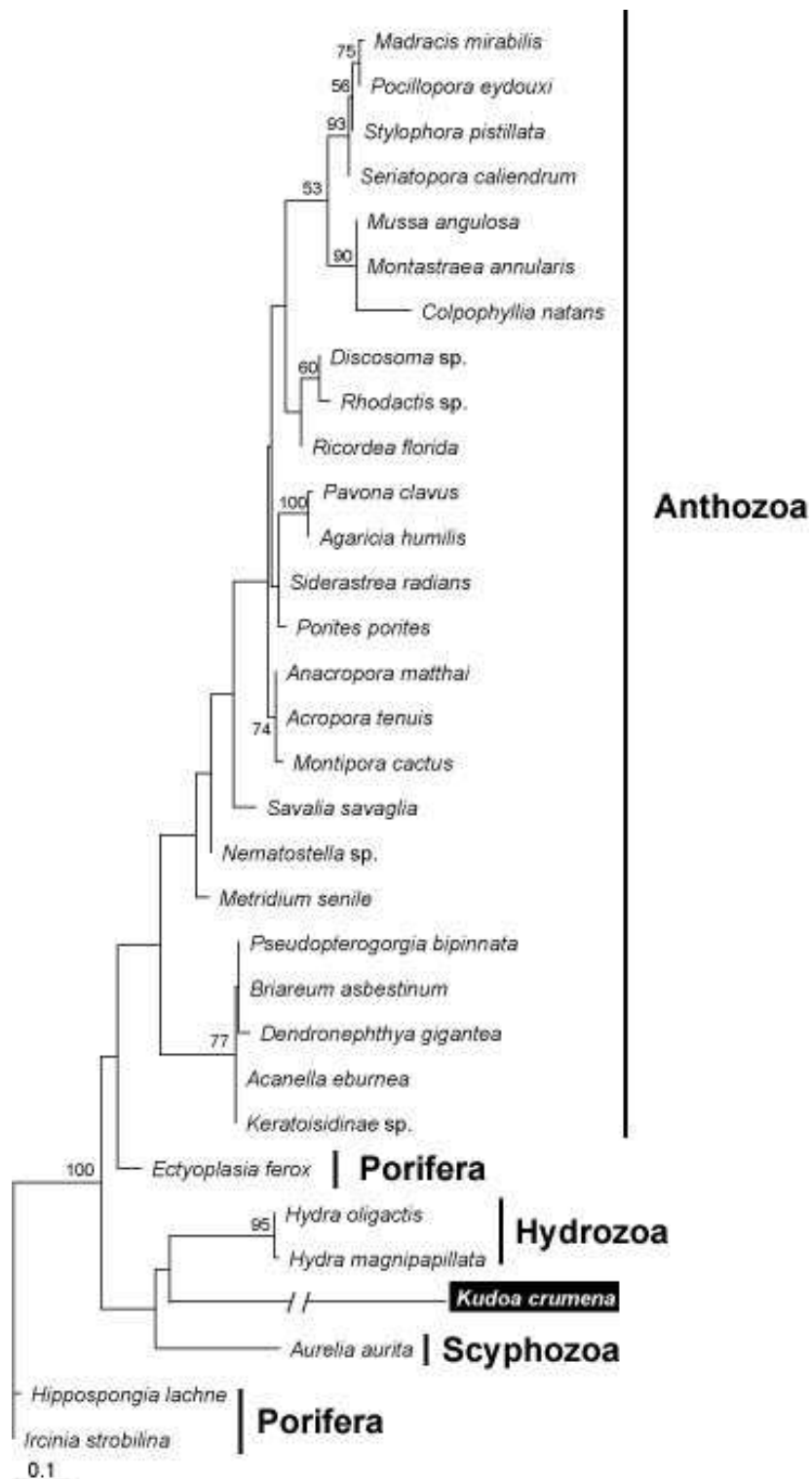
Obr. 4: Konsenzuální fylogenetický strom konstruovaný metodou maximální parsimonie.



Obr 5: Fylogenetické vztahy žahavců odvozené metodou maximální pravděpodobnosti. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapu vyšší než 50 %. Měřítko délky větví je uvedeno pod stromem. Délka větve *Polypodium hydriforme* je zkrácena na polovinu.



Obr 6: Fylogenetické vztahy žahavců odvozené distanční metodou LogDet. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapu vyšší než 50 %. Měřítko délky větví je uvedeno pod stromem. Délky větví *Kudoa crumena* a *Polypodium hydriforme* jsou zkrácené o třetinu. Porifera byla stanovena jako outgroup.



Obr 7: Fylogenetické vztahy žahavců odvozené metodou maximální pravděpodobnosti s vyloučením *Polypodium hydriforme*. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapu vyšší než 50 %. Měřítko délky větví je uvedeno pod stromem. Větev *Kudoa crumena* je zkrácena o polovinu.

4.2. Protein-kódující DNA data

V rámci bakalářské práce bylo snahou získat také sekvenční data mitochondriálních protein-kódujících genů. Opakované a modifikované PCR a nested PCR nevedly k amplifikaci produktů mitochondriálních genů myxozoi. Výsledkem byla buď sekvenčně ověřená amplifikace hostitelské DNA nebo negativní výsledek PCR. LA-PCR metoda byla zavedena z důvodu opakované amplifikace hostitelské DNA běžnou PCR. Primery použité v této metodě vymezovaly úsek několika genů a umožnily by ihned bezpečně rozpoznat amplifikovanou hostitelskou DNA, jejíž délka je známa. Ve většině případů se amplifikace vůbec nezdařila nebo došlo k amplifikaci hostitelské DNA, což bylo pro jistotu dodatečně potvrzeno sekvenováním.

Kombinace primerů pro LA-PCR:

amplifikace úseku **cox1 až cox2:**

LCO1490 - cox2F1

LCO1490 - cox2R1

HCO2198 - cox2F1

HCO2198 - cox2R1

amplifikace úseku **cox2 až 16S:**

cox2F1 - 16Smt-F

cox2F1 - 16Smt-R

cox2R1 - 16Smt-F

cox2R1 - 16Smt-R

amplifikace úseku **cox1 až cob:**

LCO1490 - cobF424

LCO1490 - cobR876

HCO2198 - cobF424

HCO2198 - cobR876

amplifikace úseku **cox2 až cob:**

cox2F1 - cobF424

cox2F1 - cobR876

cox2R1 - cobF424

cox2R1 - cobR876

amplifikace úseku **cox1 až 16S:**

LCO1490 - 16Smt-F

LCO1490 - 16Smt-R

HCO2198 - 16Smt-F

HCO2198 - 16Smt-R

amplifikace úseku **cob až 16S:**

cobF424 - 16Smt-F

cobF424 - 16Smt-R

cobR876 - 16Smt-F

cobR876 - 16Smt-R

5. Diskuze

Délka sekvence 16S rDNA zástupců myxozoi je v porovnání s ostatními žahavci velmi krátká. Průměrná délka sekvence tohoto genu u žahavců je přibližně 560 bazí, což je o 150 bazí více než získaná sekvence *Kudoa crumena*. Rovněž i obsah AT bazí je nepatrně vyšší než u ostatních žahavců (Tabulka 3). Výjimku tvoří druhy rodu *Hydra*, u kterých byl zjištěn AT obsah 75 % až 76 %. Tato hodnota AT obsahu přesně odpovídá AT obsahu celého genomu pro *Hydra oligactis* (Kayal a Lavrov 2008) a zároveň odpovídá i AT obsahu u ostatních živočichů s výjimkou žahavců (Lavrov 2007), kteří mají tento obsah o 10 % nižší. Ještě o 31 bazí kratší délka sekvence byla zjištěna u *Polypodium hydriforme*, přičemž obsah AT byl o 8 % nižší v porovnání se sekvencí *K. crumena*. Bylo prokázáno, že krátké úseky DNA sekvencí, které slouží pro účely barcodingu, můžou vypovídat o struktuře celého genomu (Min a Hickey 2007). V takovém případě by mohly mít Myxozoa i *P. hydriforme* co do velikosti velmi nezvykle malý mitochondriální genom.

Překvapující jsou minimální rozdíly u sedmi získaných 16S rDNA sekvencí myxozoi. Případná kontaminace při přípravě PCR byla vyloučena opakovaným provedením této metody s negativní kontrolou. Nepatrné rozdíly ve studovaném úseku genu jsou i u jiných skupin žahavců. Z alignmentu a stromu konstruovaného distanční metodou LogDet vyplývá velká sekvenční podobnost např. mezi druhy rodu *Madracis*, *Seriatopora*, *Stylophora* a *Pocillopora*.

Topologie stromů konstruovaných různými fylogenetickými metodami (MP, ML a LogDet) se lišily. V MP a ML analýze druhy *K. crumena* a *P. hydriforme* klastrovaly spolu. Tato fylogenetická pozice je ve shodě s prací Siddalla a kol. (1995), ve které na základě kombinované analýzy morfologických a molekulárních dat prezentovali Myxozoa jako sesterský taxon druhu *P. hydriforme*. Pozdější analýza Hanelta a kol. (1996) a Andersona a kol. (1998) vyloučila možnou příbuznost těchto taxonů na základě fenoménu zvaného Long branch attraction (LBA, přitahování dlouhých větví). Distanční metoda LogDet, která byla provedena za účelem potlačení případného LBA, potvrdila výsledky Hanelta a kol. a Andersona a kol. V této analýze se *K. crumena* větví sestersky k hydrozoím a *P. hydriforme* v rámci anthozoi. Pozice *K. crumena* byla ověřena dodatečnou analýzou ML s vyloučením sekvence *P. hydriforme*. *K. crumena* se v této analýze nevětvila v rámci anthozoi, ale klastrovala k hydrozoím stejně jako v analýze LogDet. Z uvedeného plyne, že *K. crumena* byla „přitažena“ sekvencí *P. hydriforme*. Z výsledků lze předpokládat, že správná pozice *K. crumena* na základě 16S rDNA dat je sesterská pozice ke skupině Hydrozoa. Stejná

fylogenetická pozice byla publikována Jiménez-Guri a kol. (2007) pro druh *Buddenborckia plumatellae* jako zástupce myxozoi.

Předložené výsledky fylogenetické analýzy DNA dat, která odpovídají krátkému úseku 16S rDNA sekvence, se shodují s výsledky multigenové analýzy Jiménez-Guri a kol. (2007). Pro zjištění příbuzenských vztahů myxozoi a žahavců by mohl být tedy mitochondriální genom vhodným genetickým ukazatelem. Ovšem jako ve zmíněné multigenové analýze má zástupce myxozoi v provedené analýze 16S rDNA dlouhou větev. Tento jev, který je dán vysokou substituční rychlostí v průběhu evoluce a může působit arteficiální výsledky fylogenetických analýz (Siddall a Whiting 1999), znemožňuje zjištění příbuzenského vztahu myxozoi a dalších dlouhovětvných taxonů jako je *P. hydriforme* nebo celá skupina bilaterií. 16S rDNA je tedy vhodná pro posouzení příbuznosti myxozoi v rámci žahavců, ale není vhodná pro širší analýzu myxozoi v rámci metazoi. Během bakalářské práce se nepodařilo získat žádný protein-kódující mitochondriální gen a tedy nelze posoudit vhodnost těchto genů pro řešení fylogenetických vztahů. Obdobně velmi obtížná amplifikace protein-kódujících genů myxozoi byla zaznamenána také Fialou a Bartošovou (2010) v případě jaderných genů.

6. Závěr

1. Podařilo se získat 16S rDNA sekvenci u sedmi zástupců myxozoí a druhu *Polypodium hydriforme*.
2. Byla zjištěna nezvykle krátká sekvence 16S rRNA genu jak u myxozoí tak u *P. hydriforme*.
3. Fylogenetická analýza odhalila velmi dlouhé větve u nově získaných sekvencí, které značí jejich vysokou evoluční rychlost.
4. Výsledky bakalářské práce potvrdily fylogenetickou pozici myxozoí v rámci žahavců a v blízké příbuznosti hydrozoí.
5. Byla potvrzena obtížná amplifikace protein-kódujících genů myxozoí.
6. Na základě analýzy 16S rDNA lze předpokládat, že mitochondriální data jsou vhodným markerem pro posouzení fylogenetických vztahů myxozoí a žahavců.

7. Seznam literatury

- ANDERSON C. L., CANNING E. U., OKAMURA B. 1998: A triploblast origin for Myxozoa? *Nature*, 392: 346 – 347.
- ANDERSON S., BANKIER A. T., BARRELL B. G., DE BRUIJN M. H., COULSON A. R., DROUIN J., EPERON I. C., NIERLICH D. P., ROE B. A., SANGER F., SCHREIER P. H., SMITH A. J., STADEN R., YOUNG I. G. 1981: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457 – 465.
- ARNASON U., XU X., GULLBERG A. 1996: Comparison between the complete mitochondrial DNA sequences of *Homo* and the common chimpanzee. *J. Mol. Evol.*, 42: 145 – 146.
- 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. *Int. J. Parasitol.*, 38: 1199 – 1207.
- BEAGLEY C. T., OKIMOTO R., WOLSTENHOLME D. R. 1998: The mitochondrial genome of the sea anemone *Metridium senile* (Cnidaria): Introns, a paucity of tRNA, genes and a near-standard genetic code. *Genetics*, 148: 1091 – 1108.
- BOORE J. L. 1999: Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 27: 1767 – 1780.
- BOORE J. L., COLLINS T. M., STANTON D., DAEHLER L. L., BROWN W. M. 1995: Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature*, 376: 163 – 165.
- BOYCE T. M., ZWICK M. E., AQUADRO C. F. 1989: Mitochondrial DNA in the bark weevils: Size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123: 825 – 836.
- BRIDGE D., CUNNINGHAM C. W., SCHIERWATER B., DESALLE R., BUSS L. W. 1992: Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidence from mitochondrial genome structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8750 – 8753.
- BYBEE S. M., OGDEN T. H., BRANHAM M. A., WHITING M. F. 2008: Molecules, morphology and fossils: a comprehensive approach to odonate phylogeny and the evolution of the odonate wing. *Cladistics*, 24: 477–514.
- CANNING E. U., CURRY A., FEIST S. W., LONGSHAW M., OKAMURA B. 1999: *Tetracapsula bryosalmonae* n. sp. for PKX organism, the cause of PKD in salmonid fish. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 19: 203 – 206.
- CAVELIER L., JOHANNISSON A., GYLLENSTEN U. 2000: Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PPCR. *Exp. Cell Res.*, 259: 79 – 85.

- DANIELS S. B., HERMAN R. L., BURKE C. N. 1976: Fine structure of an unidentified protozoan in the epithelium of rainbow trout exposed to water with *Myxosoma cerebralis*. J. Protozool., 23: 402 – 410.
- DE ROJAS M., MORA M. D., UBEDA J. M., CUTILLAS C., NAVAJAS M., GUEVARA D. C. 2001: Phylogenetic relationships in Rhinonyssid Mites (Acari: Rhinonyssidae) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. Experimental and Applied Acarology, 25: 957 – 967.
- DIAMANT A., LOM J., DYKOVA I. 1994: Myxidium leei n. sp., a pathogenic myxosporean of cultured sea bream Sparus-aurata. Dis. Aquat. Org., 20: 137 – 141.
- EL-MATBOULI M., HOFFMANN R. W. 1998: Light and electron microscopic study on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex* to the actinosporean stage triactinomyxon. Int. J. Parasitol., 28: 195 – 217.
- EL-MATBOULI M., HOFFMANN R. W., MANDOK C. 1995: Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxonsporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. J. Fish Biol., 46: 919 – 935.
- FIALA I. 2006: The phylogeny of Myxosporaea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. Int. J. Parasitol., 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 (submitted).
- FULLER K. M., ZOUROS E. 1993: Dispersed length polymorphism of mitochondrial DNA in the scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). Curr. Genet., 23: 365 – 369.
- HANELT B., VAN SCHYNDEL D., ADEMA C. M., LEWIS L. A., LOKER E. S. 1996: The phylogenetic position of Rhopalura ophiocomae (Orthonectida) based on 18S ribosomal DNA sequence analysis. Mol. Biol. Evol., 13: 1187 – 1191.
- HEDRICK R. P., EL-MATBOULI M., ADKISON M. A., MACCONNELL E. 1998: Whirling disease: re-emergence among wild trout. Immunol. Rev., 166: 365 – 376.
- HOFFMANN R. J., BOORE J. L., BROWN W. M., 1992: A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. Genetics, 131: 397 – 412.
- JIMENEZ-GURI E., PHILIPPE H., OKAMURA B., HOLLAND P. W. H. 2007: Buddenbrockia is a cnidarian worm. Science, 317: 116 – 118.
- KATOH K., MISAWA K., KUMA K., MIYATA T. 2002: MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res., 30: 3059 – 3066.
- KAYAL E., LAVROV D. V. 2008: The mitochondrial genome of *Hydra oligactis* (Cnidaria, Hydrozoa) sheds new light on animal mtDNA evolution and cnidarian phylogeny. Gene, 410: 177 – 186.

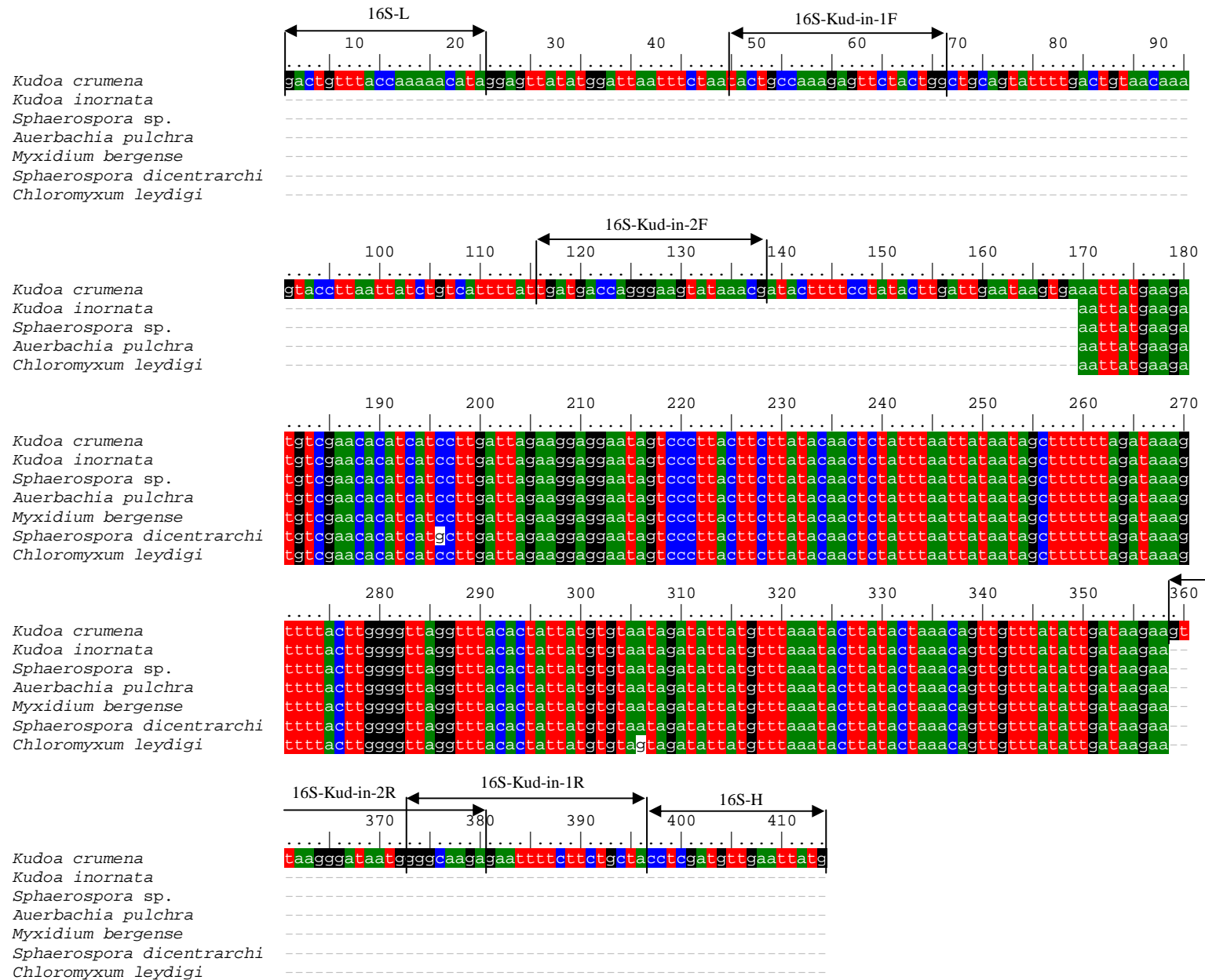
- KEDDIE E. M., HIGAZI T., UNNASCH T. R. 1998: The mitochondrial genome of *Onchocerca volvulus*: sequence, structure and phylogenetic analysis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 95: 111 – 127.
- KENT M. L., ANDREE K. B., BARTHOLOMEW J. L., EL-MATBOULI M., DESSER S. S., DEVLIN R. H., FEIST S. W., HEDRICK R. P., HOFFMANN R. W., KHATTRA J., HALLETT S. L., LESTER R. J. G., LONGSHAW M., PALENZEULA O., SIDDALL M. E., XIAO C. X. 2001: Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 48: 395 – 413.
- KENT M. L., MARGOLIS L., WHITAKER D. J., HOSKINS G. E., MCDONALD T.E. 1994: Review of Myxosporea of importance to salmonid fisheries and aquaculture in British Columbia. *Fol. Parasitol.*, 41: 27 – 37.
- KOC E. C., BURKHART W., BLACKBURN K., MOYER M. B., SCHLATZER D. M., MOSELEY A., SPREMULLI L. L. 2001: The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *J. Biol. Chem.*, 276: 43958 – 43969.
- LAVROV D. V. 2007: Key transitions in animal evolution: a mitochondrial DNA perspective. *Integr. Comp. Biol.*, 47: 734 – 743.
- LOM J., DYKOVA I. 2006: Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Fol. Parasitol.*, 53: 1 – 36.
- LOM J., DYKOVA I., 1992: Protozoan parasites of fishes. Elsevier Science, Amsterdam
- MILYUTINA I. A., ALESHIN V. V., MIKRJUKOV K. A., KEDROVA O. S., PETROV N. B. 2001: The unusually long small subunit ribosomal RNA gene found in amitochondriate amoeboflagellate *Pelomyxa palustris*: its rRNA predicted secondary structure and phylogenetic implication. *Gene*, 272: 131 – 139.
- MIN X. J., HICKEY D. A. 2007: DNA barcodes provide a quick preview of mitochondrial genome composition. *Plos One*, 2: e325.
- MONTEIRO A. S., OKAMURA B., HOLLAND P. W. H. 2001: Buddenbrockia is a Myxozoa. *A. Zool.*, 41: 1648 – 1648.
- MORAN J. D. W., MARGOLIS L., WEBSTER J. M., KENT M. L. 1999: Development of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea) in netpen-reared Atlantic salmon determined by light microscopy and a polymerase chain reaction test. *Dis Aquat. Org.*, 37: 185 – 193.
- MORITZ C., DOWLING T. E., BROWN W. M. 1987: Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269 – 292.
- O BRIEN T. W. 1971: The general occurrence of 55S ribosomes in mammalian liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 246: 3409 – 3417.

- OJALA D., MONTOYA J., ATTARDI G. 1981: tRNA punctuation model of FNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290: 470 – 474.
- OKIMOTO R., MACFARLANE J. L., CLARY D. O., WOLSTENHOLME D. R. 1992: The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics*, 130: 471 – 498.
- PAGE R. D. M. 1996: TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.*, 12: 357 – 358.
- POSADA D., CRANDALL C. A. 1998: MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bionformatics*, 14: 817 – 818.
- PRUNESCU C. C., PRUNESCU P., PUCEK Z., LOM J. 2007: The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha). *Fol. Parasitol.*, 54: 159 – 164.
- SHADEL G. S., CLAYTON D. A. 1997: Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.*, 66: 409 – 435.
- SIDDAL M. E., MARTIN D. S., BRIDGE D., DESSER S. S., CONE D. K. 1995: The demise of a phylum of protists: Phylogeny of myxozoa and other parasitic cnidaria. *J. Parasitol.*, 81: 961 – 967.
- SIDDALL M. E., WHITING M. F. 1999: Long-branch abstractions. *Cladistics*, 15: 9 – 14.
- SITJA-BOBADILLA A., ALVAREZ-PELLITERO P. 1993: Pathologic effects of *Sphaerospora dicentrarchi* Sitja-Bobadilla and Alvarez-Pellitero, 1992 and *S. testicularis* Sitja-Bobadilla and Alvarez-Pellitero, 1990 (Myxosporidia: Bivalvulida) parasitic in the Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei: Serranidae) and the cell-mediated immune reaction: a light and electron microscopy study. *Parasitol. Res.*, 79: 119 – 129.
- SMITH M. J., ARNDT A., GORSKI S., FAJBER E. 1993: The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *J. Mol. Evol.*, 36: 545 – 554.
- SMOTHERS J. F., VONDOHLEN C. D., SMITH L. H., SPALL R. D. 1994: Molecular evidence that the Myxozoan Protists are Metazoans. *Science*, 265: 1719 – 1721.
- SUAREZ-DIAZ E., ANAYA-MUNOZ V. H. 2008: History, objectivity, and the construction of molecular phylogenies. *Stud. Hist. Phil. Biol. Biomed. Sci.*, 39: 451 – 468.
- SWOFFORD D. L. 2001: PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods), Version 4.0b8. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- TAKAMATSU C., UMEDA S., OHSATO T., OHNO T., ABE Y., FUKUOH A., SHINAGAWA H., HAMASAKI N., KANG D. 2002: Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep.*, 3: 451 – 456.

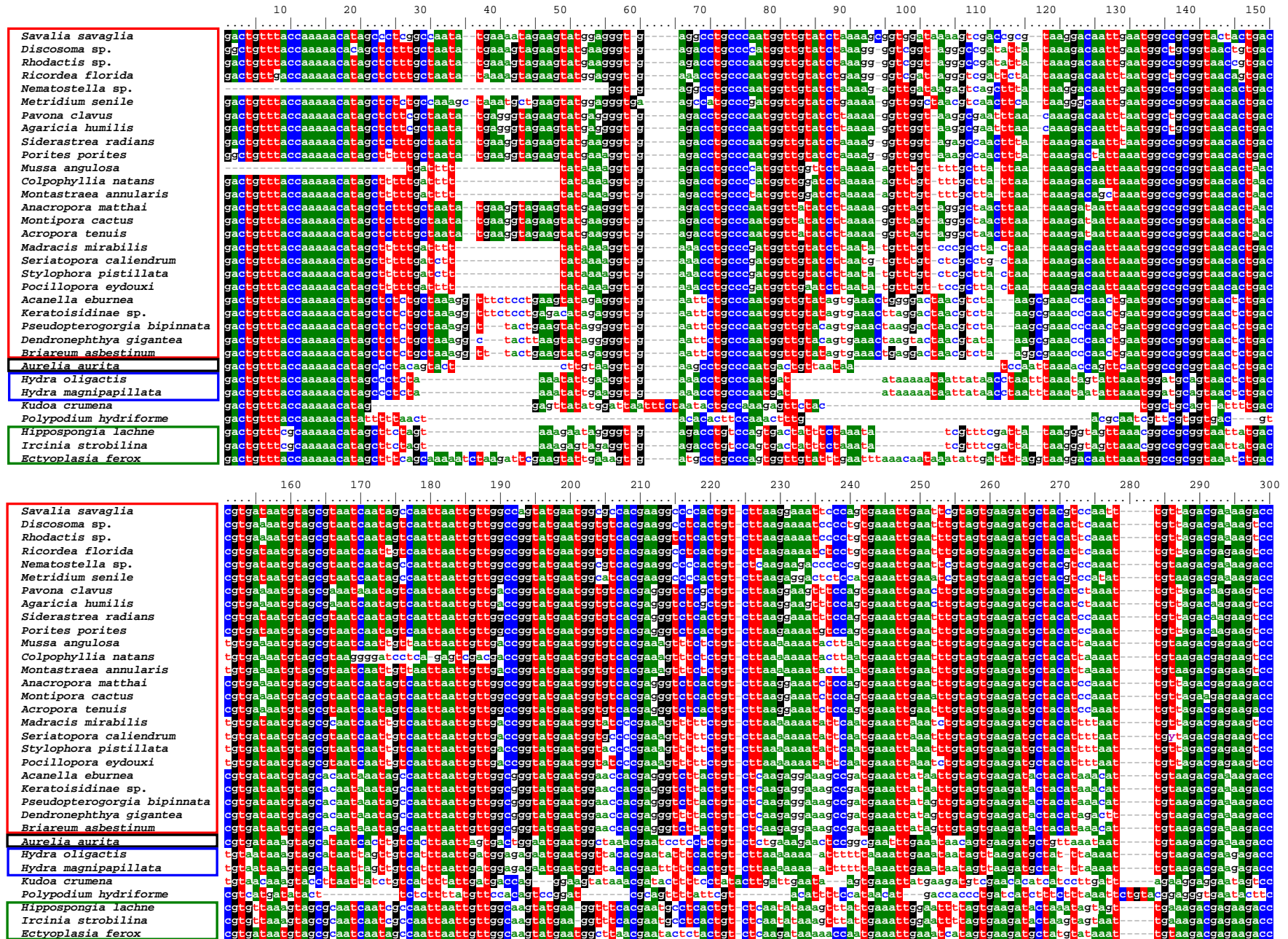
- WESTFALL J. A. 2004: Neural pathways and innervation of cnidocytes in tentacles of sea anemones. *Hydrobiologia*, 530: 117 – 121.
- WOLF K., MARKIWIĆ M. E. 1984: Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science*, 225: 1449 – 1452.
- XIAO C., DESSER S. S. 2000: The longevity of actinosporean spores from oligochaetes of Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario, and their reaction to fish mucus. *J. Parasitol.*, 86: 193 – 195.
- ZARDOYA R., GARRIDO-PERTIERRA A., BAUTISTA J. M. 1995: The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Mol. Evol.*, 41: 942 – 951.

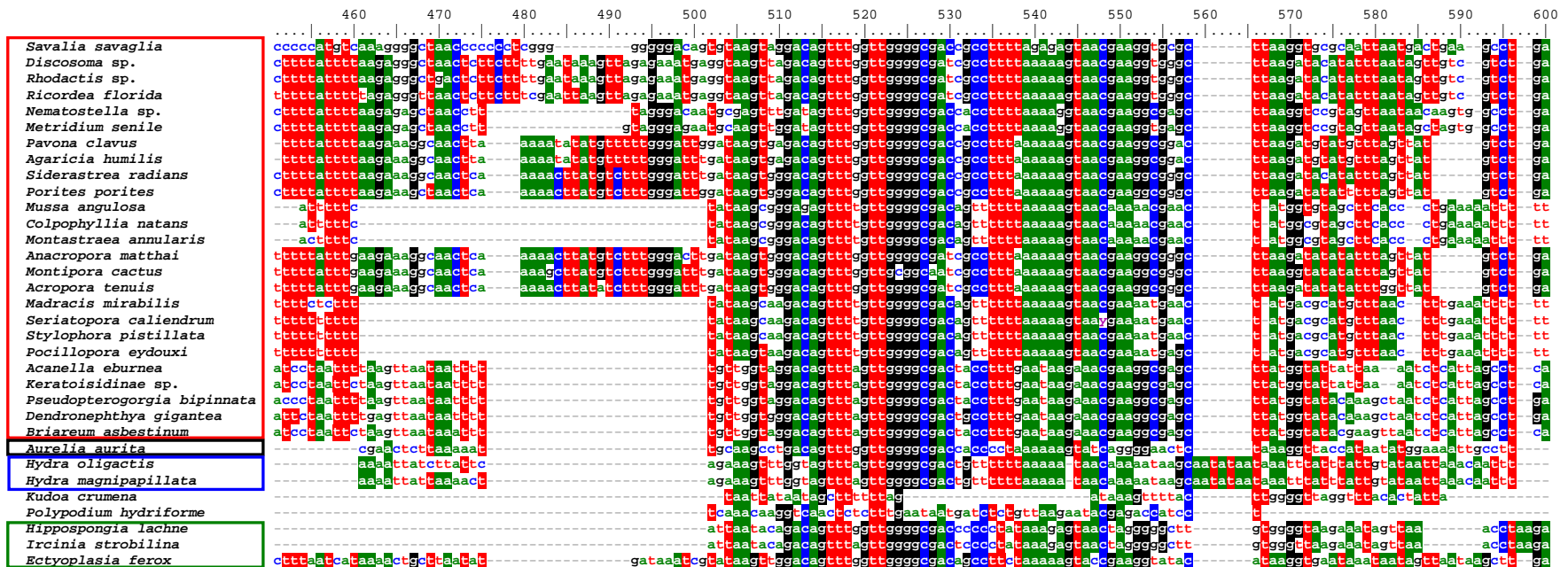
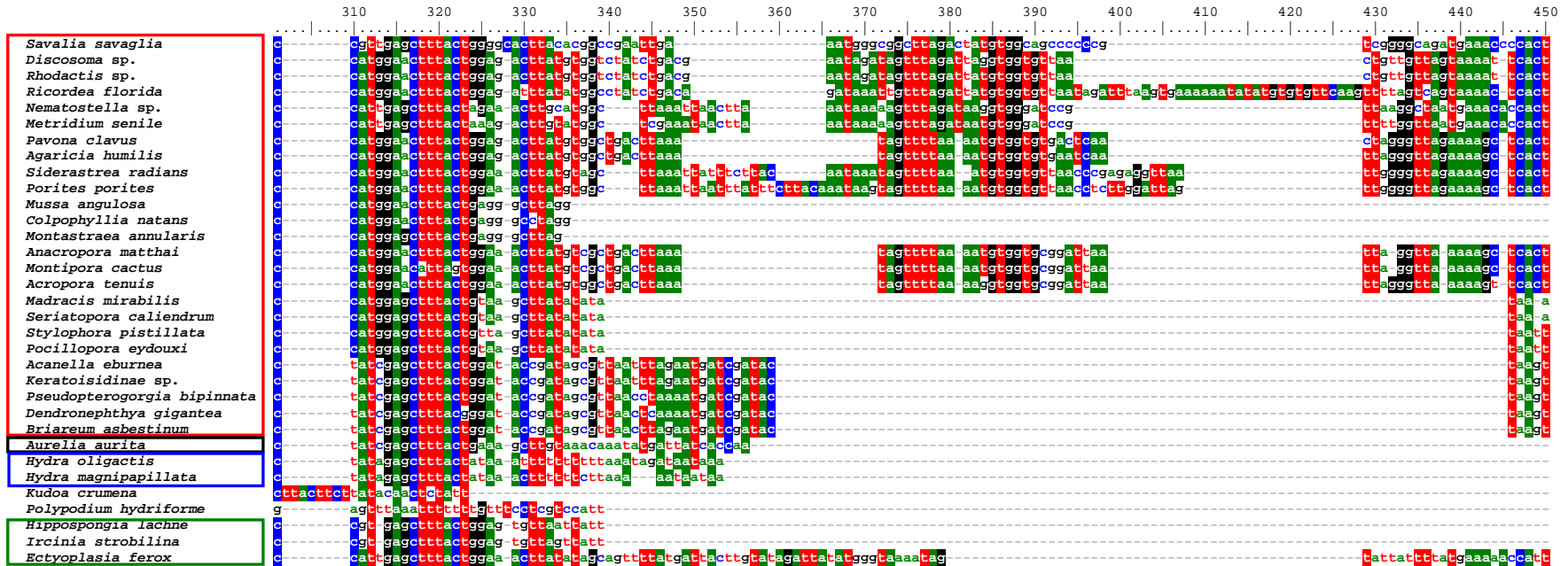
Přílohy

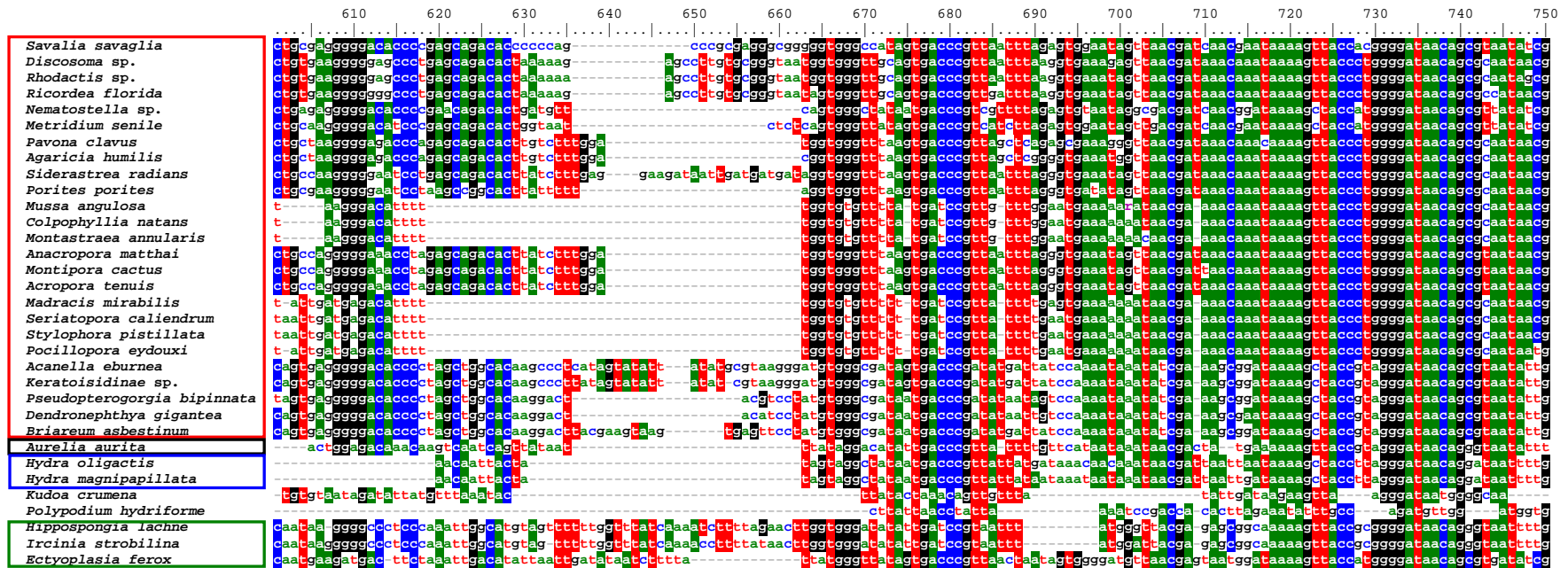
Příloha 1: Alignment získaných sekvencí myxozoií.



Príloha 2: Alignment: *K. crumena*, *P. hydriforme*, Anthozoa, Scyphozoa, Hydrozoa, Porifera.







Vysvětlivky:

- Anthozoa
- Scyphozoa
- Hydrozoa
- Porifera