

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Fylogenetické vztahy myxosporeí obojživelníků

Diplomová práce

Martina Cinková

Školitel: RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

České Budějovice 2012

Diplomová práce

Cinková M., 2012: Fylogenetické vztahy myxosporeí obojživelníků [The phylogenetic relationships of Myxosporea infecting amphibians. Mgr. Thesis, in Czech] – 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Myxosporea infecting amphibians represents a small group of Myxozoa and there are only few molecular data available for revealing of the phylogenetic relationships of amphibian myxosporeans. This master thesis aims to obtain new SSU rDNA sequences and study the phylogenetic relationships of amphibian myxosporeans. Eleven new myxosporean sequences were obtained from nine frog hosts and one salamander host. The resulted phylogenetic relationships are shown in the trees.

Tato práce byla financována z projektů Grantové agentury ČR (P519/09/204 a 506/10/2330).

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 nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Martina Cinková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla velice poděkovat svému školiteli Ivanu Fialovi za pomoc s touto diplomovou prací, dobré rady a přátelský přístup. Dále bych chtěla poděkovat celé Laboratoři rybí protistologie parazitologického ústavu, především Pavle Bartošové a Alče Kodádkové za pomoc a rady v laborce. Nemalý dík patří také mým rodičům a příteli, kteří mě podporují ve studiu.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1. ÚVOD | 1 |
| 1.1 Základní charakteristika | 1 |
| 1.2 Klasifikace | 3 |
| 1.3 Fylogenetické vztahy..... | 3 |
| 1.4 Myxozoa u obojživelníků..... | 6 |
| 1.5 Fylogeneze myxozoí u obojživelníků | 8 |
| 2. CÍLE PRÁCE | 10 |
| 3. MATERIÁL A METODY | 11 |
| 3.1 Materiál | 11 |
| 3.2 Příprava vzorků pro skanovací elektronový mikroskop (SEM) | 12 |
| 3.3 Izolace DNA..... | 13 |
| 3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 14 |
| 3.5 Klonování a izolace plazmidové DNA..... | 16 |
| 3.6 Sekvenování | 17 |
| 3.7 Fylogenetická analýza | 17 |
| 4. VÝSLEDKY | 18 |
| 4.1 Morfologická dokumentace | 18 |
| 4.2 Sekvenční a fylogenetická analýza | 20 |
| 5. DISKUZE | 25 |
| 5.1 Fylogenetické vztahy..... | 25 |
| 5.2 Determinace nalezených druhů | 26 |
| 6. ZÁVĚR | 28 |
| 7. SEZNAM LITERATURY | 29 |

1. Úvod

1.1. Základní charakteristika

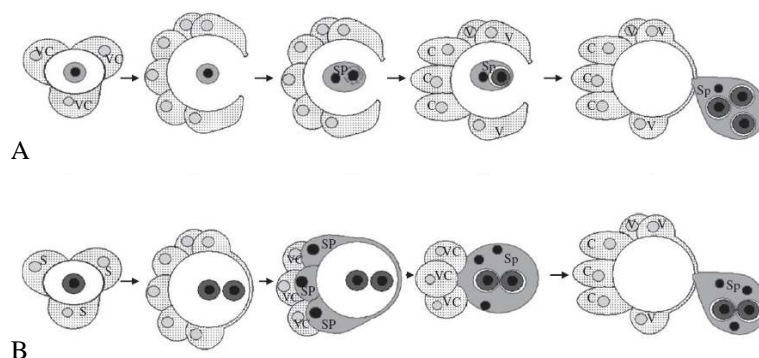
Myxosporea jsou významní endoparazité bezobratlých, zejména maloštětinatců a polyštětinatců, a obratlovců a to především mořských a sladkovodních ryb. Dalšími hostiteli z řad obratlovců jsou obojživelníci a plazi, jejich výskyt byl potvrzen i u ptáků (Bartholomew a kol. 2008) a savců (Prunescu a kol. 2007). Dosud bylo popsáno přes 2 300 druhů myxosporeí z ryb (Morris 2010) a 25 druhů z obojživelníků (Eiras 2005, Hartigan a kol. 2012). Třída Myxosporea patří spolu s třídou Malacosporea (parazité sladkovodních mechovek) do kmene Myxozoa.

Myxospory jsou tvořeny dvěma a více chlopněmi, jednou až dvěma sporoplasmami a jedním nebo více pólovými váčky, které obsahují vystřelovací vlákna sloužící k přichycení. Podle počtu chlopní a pólových váček se Myxosporea rozdělují na dva řády: Bivalvulida a Multivalvulida. Spory bivalvulidů mají dvě chlopně a nejčastěji dva, zřídka čtyři nebo jeden pólový váček a spory multivalvulidů se vyznačují větším počtem chlopní i pólových váček. Vegetativní stádia mohou být coelozoická (v tělních dutinách nebo dutinách tělních orgánů) nebo histozoická a intercelulární nebo intracelulární.

Životní cyklus byl poprvé popsán Wolfem a Markiwem (1984) u *Myxobolus cerebralis* parazitující na lososovitých rybách, které jsou infikovány triaktinomyxonovými sporami po prodělání vývoje v nitěnkách (*Tubifex tubifex*). Životní cyklus probíhá ve dvou hostitelích. V obratlovcích se nachází myxosporová fáze, v jejímž konečném stádiu vznikají myxospory a v kroužkovcích probíhá aktinosporová fáze a vznikají zde aktinospory. Poté, co aktinospora opustí kroužkovce, se pomocí pólového vlákna přichytí na obratlovce a uvolní do hostitele sporoplasmu, která dále migruje hlouběji do hostitele. Následuje presporogenní vývoj, během kterého dochází k namnožení parazitických stádií. Vznikají zde útvary typické pro Myxozoa tzv. buňka v buňce, kdy se vytváří uvnitř primárních buněk buňky sekundární. Po presporogenní fázi parazit putuje na konečné místo své lokalizace uvnitř hostitele a vytváří plasmodium (nebo pseudoplasmodium), ve kterém po složitém vývoji dělení a diferenciaci původních generativních buněk vznikají sporoblasty, které dozrávají a dávají vznik myxosporám. Myxospory jsou nakonec uvolněny z hostitele a infikují kroužkovce. Vývoj aktinospor v kroužkovcích je rozdělen na tři části – schyzogonie, gametogonie a sporogonie. Při schyzogonii se nejdříve ve střevní dutině

otevřou spory a uvolní se dvoujaderné sporoplasmy, které se začnou dělit. V gametogonii se dvoujaderné buňky dělí na stádia se čtyřmi jádry. Dvě jsou somatická a dvě generativní, která se dále odlišují na α a β . Následují tři mitotická dělení generativních buněk a jedno meiotické dělení a tím vzniká šestnáct haploidních gametocyst a šestnáct polárních tělísek. Každá gametocysta α se spojí s gametocystou β a produkují osm zygot. V poslední fázi - sporogonii se každá zygota několikrát mitoticky dělí a postupně se buňky diferencují na kapsulogenní, valvogenní a buňky, ze kterých později vzniká sporoplasma. Konečné stádium obsahuje 8 aktinosporových spor.

Dříve se předpokládalo, že k přeměně ze sporoblastu na sporoplasmu dochází endogenním pučením, jak uvádí většina prací (např. Kent a kol 2001) a že se sporoplasma skládá z jedné zárodečné buňky (Obr. 1A). Podle Morrise (2010) však vzniká sporoplasma ze sporoplasmogenních buněk, které obklopi zárodečné buňky a splynou ve sporoplasmu (Obr. 1B).



Obr. 1: Navržené cesty přeměny sporoblastu na sporoplasmu. Původní teorie - přeměna pučením (A), nová teorie splnutím (B). (Převzato Morris 2010)

Do kmene Myxozoa patří parazité, kteří jen zřídka způsobují smrt svého hostitele, ale je zde několik ekonomicky významných druhů, které snižují tržní hodnotu ryby. Mezi často napadené ryby patří lososovité ryby, které může infikovat *Ceratomyxa shasta*, která způsobuje infekci zažívacího ústrojí (Kent a kol 1994), *Tetracapsuloides bryosalmonae* způsobující proliferativní onemocnění ledvin (Canning a kol 1999) a *Myxobolus cerebralis* ničící chrupavku a tkáň mladých ryb. Při těžkých infekcích způsobuje kosterní deformace až smrt. *Myxobolus cerebralis* je také zodpovědný za velký pokles volně žijících pstruhů v USA (Hedrick a kol. 1998). *Enteromyxum leei* způsobuje chronické střevní katary, které často vedou u středomořských cejnů (*Sparus aurata*) až ke smrti (Diamant 1994). Dalším významným druhem je *Kudoa thyrsites*, ta sice nezpůsobuje přímo smrt jedinců, ale napadá svalovou tkáň a tím vede ke snížení tržní hodnoty (Moran a kol. 1999). *Sphaerospora*

testicularis a *S. dicentrarchi* parazitující u mořských okounů (*Dicentrarchus labrax*) způsobují silné infekce spojené s úhynem mladých ryb (Alvarez-Pellitero a Sitja-Bobadilla 1993) nebo parazitickou kastrací (Nóbrega a kol. 2009).

1.2. Klasifikace

Stále platná klasifikace je založena na morfologii spor, zejména uspořádání chlopní a pólových váčků.

Kmen Myxozoa obsahuje třídu Malacosporea a třídu Myxosporea. Malacosporea jsou parazité mechovek a ryb s jedním řádem Malacovalvulida, do kterého patří dva rody *Tetracapsuloides* a *Buddenbrockia*. Třída Myxosporea je rozsáhlejší. Je rozdělena na dva řády podle počtu chlopní. Do řádu Bivalvulida patří parazité mořských a sladkovodních živočichů mající dvě chlopně. Tento řád zahrnuje ještě podřády Variisporina (např. *Ceratomyxa*, *Chloromyxum*, *Hoferellus*, *Myxidium*, *Myxobilatus*, *Ortholinea*, *Parvicapsula*, *Polysporoplasma*, *Sinuolinea*, *Sphaerospora*, *Zschokkella*), Platysporina (např. *Myxobolus*, *Henneguya*, *Thelohanellus*) a Sphaeromyxina (*Sphaeromyxa*). Druhý řád Myxosporei je řád Multivalvulida vyznačující se větším počtem chlopní než dvě a jde většinou o mořské druhy jako je *Kudoa*, *Hexacapsula*, *Trilospora* a *Unicapsula*.

Toto zařazení však nezohledňuje životní cyklus, hostitele ani fylogenetické vztahy získané pomocí analýzy genu pro RNA malé ribosomální podjednotky (SSU rDNA).

1.3. Fylogenetické vztahy

Původ myxozoi byl donedávna nejasný. Původně byla řazena mezi protista. Weill (1938) však zjistil, že jejich spory jsou mnohobuněčné, a že by měla být zařazena mezi Metazoa. Kvůli podobnosti pólových váčků u myxozoi s nematocystami u žahavců se přisuzoval původ k žahavcům. K systematické změně došlo ovšem mnohem později na základě fylogenetické analýzy. Smothers a kol. (1994) ukázali díky sekvencím SSU rDNA, že Myxozoa jsou příbuzná s bilateriemi jako sesterská skupina nematod. Tuto hypotézu podporovala také morfologie *Buddenbrockia plumattela* ze skupiny Malacosporea (Okamura a kol. 2002) a také nesprávně identifikované Hox geny myxozoi shodné s bilateriemi (Anderson a kol. 1998), u kterých byl později prokázán původ

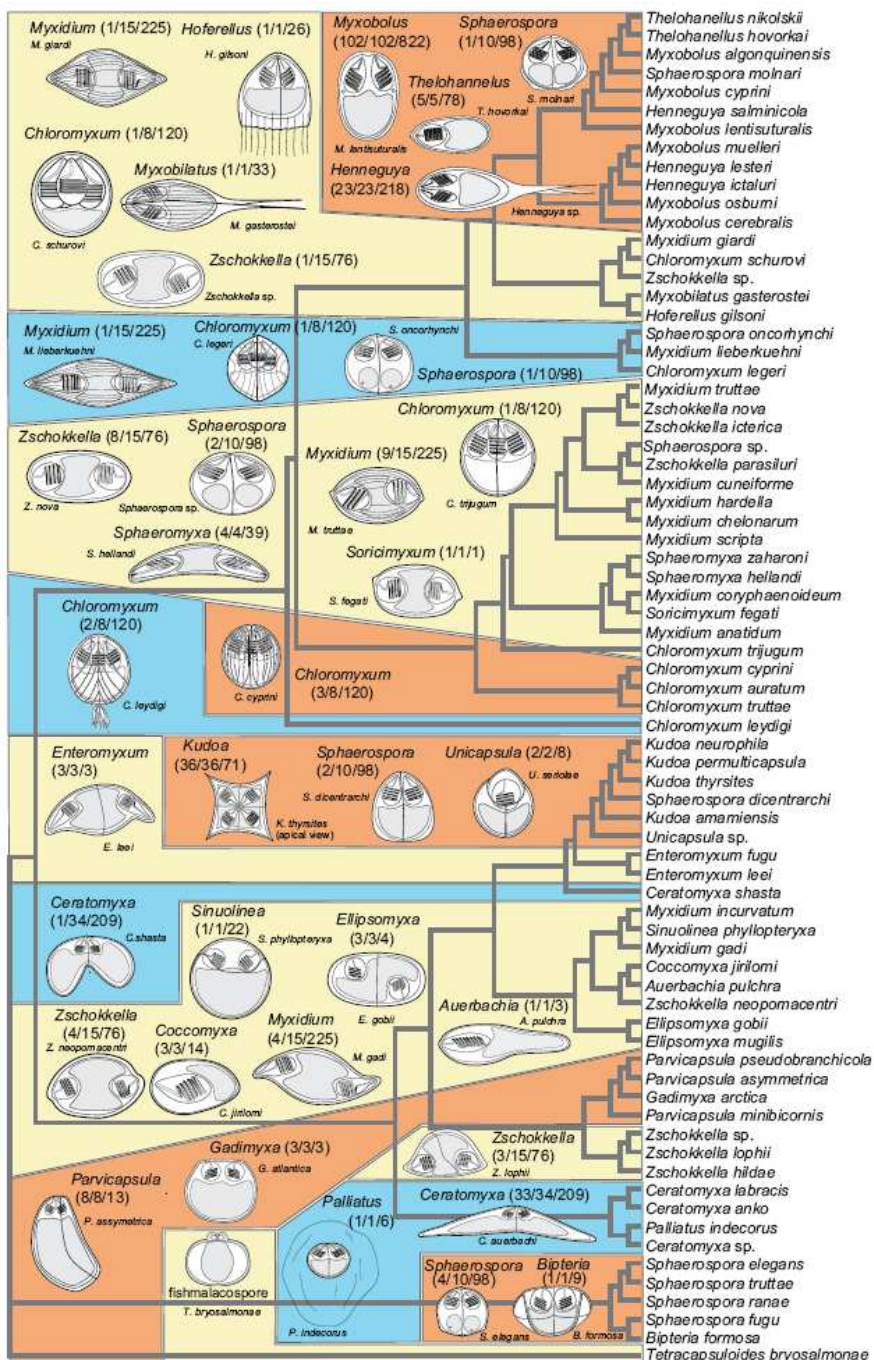
z hostitelské tkáně (Jiménez-Guri a kol. 2007). Druhá hypotéza podporovaná také fylogenetickými daty a morfologií pólových váčků řadí Myxozoa mezi žahavce. Pólové váčky myxozoi a nematocysty žahavců si jsou podobné ve velikosti, mají víčko a vlákno, které pokračuje do stěny váčku, a jsou aktivovány tlakem (Cannon a Wagner 2003). Tyto dvě hypotézy jsou podporovány protichůdnými fylogenetickými analýzami sekvencí SSU rDNA. Často jsou v nich Myxozoa řazena jako sesterský taxon k parazitickému žahavci *Polypodium hydriforme* a tyto dva taxony sestersky k bilateriím (Zrzavý a Hypša 2003, Evans a kol. 2008). Morfologie myxozoi a *P. hydriforme* je odlišná, i když tyto taxony mají některé podobné znaky – pólové váčky podobné nematocystám a endoparazitický způsob života u ryb. *P. hydriforme* má narozdíl od myxozoi volně žijící stádium s úponem a jedním ústním otvorem. Přestože SSU rDNA sekvence nemají vysokou homologii a v analýzách jsou charakterizovány dlouhými větvemi, může zde docházet k artefaktu přitahování dlouhých větví (Kim a kol. 1999). Pokud se do analýzy přidá více SSU rDNA sekvencí ze žahavců tak Myxozoa zůstávají zařazena k bilateriím bez ohledu na přítomnost *P. hydriforme* (Evans a kol. 2008). Nicméně zásadní význam má objev minikolagenů u myxozoi – kmenově specifický gen kódující proteiny nematocyst žahavců silně podporuje zařazení myxozoi k žahavcům (Holland a kol. 2010).

První rozsáhlejší fylogenetická analýza oddělila sladkovodní a mořská myxosporea do dvou hlavních větví (Kent a kol. 2001) a toto zjištění bylo i potvrzeno v dalších studiích (např. Fiala 2006). Kromě prostředí je dalším společným faktorem myxosporeí v obou skupinách i délka SSU rDNA sekvence. Většina mořských druhů má kratší sekvence SSU rDNA než druhy ve sladkovodní linii, které narozdíl od mořských druhů mají více než 2 000 nukleotidů (Fiala 2006). Rozdíly v délce sekvencí jsou způsobeny množstvím inzertů ve variabilních oblastech (Fiala a Dyková 2004). Kromě zmíněných dvou hlavních fylogenetických linií se na základě SSU rDNA analýzy vyčleňuje třetí skupina nazvaná *Sphaerospora sensu stricto*, kam se řadí *Sphaerospora truttae*, *S. elegans*, *S. ranae* a *Leptotheca fugu* (Jirků a kol. 2007). Tato skupina je také charakteristická typickou délkou SSU rDNA svých zástupců, kteří mají mimořádně dlouhé inzerty a celková délka SSU rDNA je přes 2 500 bp (Holzer a kol. 2007).

Obě hlavní linie, mořská a sladkovodní, se dále fylogeneticky člení do podskupin (subkladů). Vztahy jednotlivých podskupin jsou v rámci mořské linie nejasné. I kombinovaná analýza SSU a LSU rDNA nedokázala poskytnout dostatečnou fylogenetickou informaci pro vyřešení příbuznosti těchto podskupin (Bartošová a kol. 2009).

V rámci sladkovodní linie je většina vztahů vyřešena a v jednotlivých analýzách se zásadně nemění.

Společným znakem zástupců jednotlivých podskupin v mořské i sladkovodní linii je, že parazitují ve stejném hostitelském orgánu. Lokalizace v hostiteli je tedy jedním z hlavních kritérií klastrování druhů ve fylogenetickém stromu (Holzer a kol. 2004). Morfologie spory, která je nejdůležitější pro systematické zařazení myxosporeí, má mnohem menší souvislost s evolucí myxosporeí (Fiala a Bartošová 2010) (Obr. 2).



Obr. 2.: Analýza maximální pravděpodobnosti založená na SSU rDNA datech. (Převzato Fiala a Bartošová 2010)

1.4. Myxozoa u obojživelníků

Myxozoa jsou parazité především ryb, ovšem nálezy u obojživelníků přibývají a v současnosti je popsáno 25 druhů. Přesto jsou Myxozoa u obojživelníků velmi málo studována a chybí zejména údaje o jejich životním cyklu. Není důkaz o existenci přímého či nepřímého (vícehostitelského) životního cyklu. Předpokládá se, že bude podobný, jako byl poprvé dokumentován Wolfem a Markiwem (1984) u ryb (Eiras 2005).

Popsané druhy byly zařazeny do následujících rodů *Myxobolus*, *Myxidium*, *Hoferellus*, *Chloromyxum*, *Caudomyxum*, *Sphaerospora*, *Zschokkella* a *Cystodiscus* (Eiras 2005; Jirků 2006; Hartigan a kol. 2012). Vzhledem k poměrně malému počtu popsáných druhů je toto rodové spektrum poměrně široké. V následující tabulce (Tab. 1) jsou hlavní údaje o všech dosud nalezených myxozoích obojživelníků.

Tab. 1: Přehled myxozoí obojživelníků.

| MYXOZOA | HOSTITEL | PŮVOD | AUTOŘI POPISU |
|-------------------------------|--|------------------------|-------------------|
| <i>Caudomyxum caudatum</i> | <i>Triturus cristatus</i> (žlučník) | Francie | Upton a kol. 1995 |
| <i>Chloromyxum aegypticus</i> | <i>Amietophrynus regularis</i> (varlata) | Egypt | Reda 2010 |
| <i>Chloromyxum careni</i> | <i>Megophrys nasuta</i> (ledviny) | Malajský poloostrov | Mutschmann 1999 |
| <i>Chloromyxum protei</i> | <i>Proteus anguineus</i> (ledviny) | Jadran | Joseph 1905 |
| <i>Chloromyxum salamandre</i> | <i>Eurycea multiplicata</i> (žlučník) | USA (Texas) | Upton a kol. 1995 |
| <i>Hoferellus anurae</i> | <i>Hyperolius concolor</i> (ledviny) | Nigérie, Ghana | Mutschmann 2004 |
| <i>Myxidium boulengeri</i> | <i>Quasipaa boulengeri</i> (žlučník) | Čína | Li 1993 |
| <i>Myxidium typhoni</i> | <i>Rhinella margantifera</i> (žlučník) | Peru | Gray 1993 |
| <i>Myxidium haldari</i> | <i>Hyla arborea</i> (žlučník) | Indie | Sarkar 1982 |
| <i>Cystodiscus immesus</i> | <i>Leptodactylus bolivianus</i> (žlučník) | Brazílie, Austrálie | (Lutz1889) |

Tab. 1: Pokračování: Přehled myxozoi obojživelníků.

| MYXOZOA | HOSTITEL | PŮVOD | AUTOŘI POPISU |
|---------------------------------|---|------------------------|----------------------------|
| <i>Myxidium lesminteri</i> | <i>Tomopterna krugerensis</i> (žlučník) | JAR, Namíbie | Delvinquier a kol. 1992 |
| <i>Cystodiscus melleni</i> | <i>Pseudocris trisenata</i> (žlučník) | USA (Nebraska) | (Jirků a kol. 2006) |
| <i>Myxidium serotoninum</i> | <i>Rana pipiens</i> (žlučník) | USA (Minnesota) | Kudo a Sprague 1940 |
| <i>Cystodiscus australis</i> | <i>Limnodynastes peronii</i> (žlučník) | Austrálie | Hartigan a kol. 2012 |
| <i>Cystodiscus axonis</i> | <i>Litoria raniformis</i> (žlučník) | Austrálie | Hartigan a kol. 2012 |
| <i>Myxobolus fallax</i> | <i>Litoria fallax</i> (varlata) | Austrálie | Browne a kol. 2002 |
| <i>Myxobolus hylae</i> | <i>Litona aurea</i> (varlata, žlučník) | Austrálie | Johnson a Bancroft 1918 |
| <i>Myxobolus bufonis</i> | <i>Anietophryus myxulatus</i> (varlata) | Kamerun | Upton a kol. 1992 |
| <i>Myxobolus ranae</i> | <i>Rana temporaria</i> (kůže) | Švýcarsko | Guyenot a Naville 1922 |
| <i>Myxobolus chimbuensis</i> | <i>Litoria darlingtoni</i> (varlata) | Papua Nová Guinea | Ewers 1973 |
| <i>Sphaerospora ohlmacheri</i> | <i>Anaxyrus terrestris</i> (ledviny) | Kanada, USA | Desser 1986 |
| <i>Sphaerospora mackenzii</i> | <i>Lemnectus limnocharis</i> (močový měchýř) | Indie | Gunter a Adlard 2010 |
| <i>Sphaerospora ranae</i> | <i>Rana daluatra</i> (ledviny) | Francie, Belgie, ČR | Jirků a kol. 2007 |
| <i>Zschokkella melanosticti</i> | <i>Duttaphrynus melanostictus</i> (žlučník) | Indie | Lom a Dyková 2006 |
| <i>Zschokkella auerbachii</i> | <i>Duttaphrynus melanostictus</i> (žlučník) | Indie | Chakravaty 1940 |

Myxozoa je kmen parazitů způsobující významné nemoci ryb. Nicméně u obojživelníků je výskyt onemocnění vzácný. Je však zjištěno několik druhů působících patologické změny hostitelů. Například *Litoria darlingtoni* napadená *Myxobolus*

chimbuensis může vykazovat mírné patologické změny jako je menší počet spermií, malá meiotická aktivita a zvětšená a bledá varlata (Ewers 1973). Těžké infekce vaječníků nebo varlat mohou vést až k parazitické kastraci. *Chloromyxum careni* způsobuje malé změny v epiteliálních buňkách nefronů u *Megophrys nasuta* (Mutschmann 1999). V některých případech může vést infekce až k smrti hostitele. Trofozoiti *Myxidium sp.* ve žlučovodech *Litoria caerulea* způsobují roztažení a částečné okluze žlučovodu (Hill a kol. 1997). Mutschmann (2004) popsal patologické změny ledvin u žab *Africalus dorsalis* a *Hyperolius concolor* způsobenou *Hoferellus anurae*. Při těžkých infekcích se mohou na orgánech vytvářet až makroskopické cysty různých velikostí, které jsou způsobeny velkým množstvím parazitů.

1.5. Fylogeneze myxozoi u obojživelníků

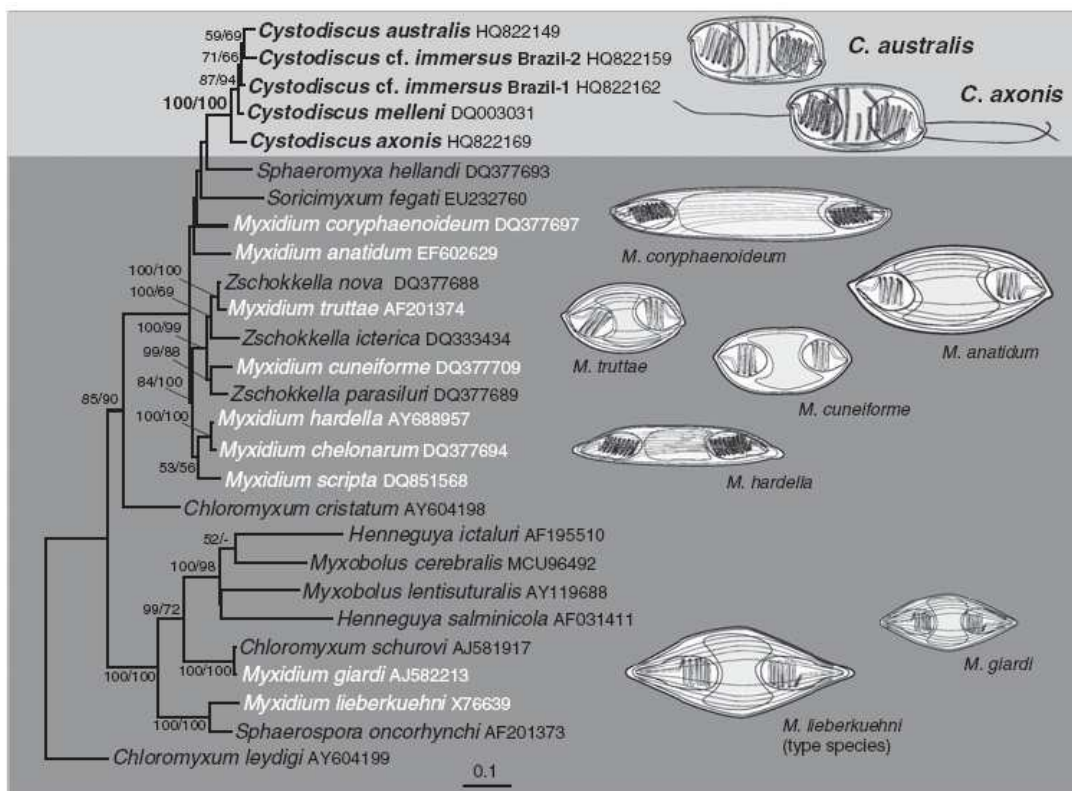
Celkový obraz fylogeneze myxozoi u obojživelníků není dosud zcela jasný. Je to dáno především malým množstvím popsaných myxozoi a ještě menším počtem známých SSU rDNA sekvencí. Z objevených 25 druhů je v genové bance dostupných pouze šest sekvencí. Jde o *Chloromyxum careni*, *Sphaerospora ranae* a čtyři druhy rodu *Cystodiscus* – *C. immersus*, *C. melleni*, *C. australis* a *C. axonis*.

SSU rDNA sekvence druhu *Chloromyxum careni* parazitující v ledvinách je jediná dostupná sekvence druhu rodu *Chloromyxum* z obojživelníků. Fylogeneticky však není blízce příbuzný k druhům z rodu *Chloromyxum* parazitující u ryb, ale vytváří samostatnou linii na bázi sladkovodních kladů označovaných *Myxobolus* a *Myxidium lieberkuehni*. To je podpořeno jak SSU tak LSU rDNA analýzou (Jirků a kol. 2011). V této analýze skupina *Myxobolus* však obsahuje i sekvence blízce příbuzných druhů *Myxidium giardi*, *Chloromyxum sp.*, *Zschokkella sp.*, *Hoferellus gilsoni* a *Myxobilatus gasterostei*, které parazitují v močovém měchýři a ledvinách. To je ve shodě s dřívějším zjištěním, že Myxozoa jsou řazena podle lokalizace v hostiteli (Holzer a kol. 2004).

Stejně jako *C. careni* i *Sphaerospora ranae* parazituje v ledvinách obojživelníků. Jak ukázala výše zmíněná analýza Jirků a kol. (2011) tyto dva druhy spolu neklastují. *S. ranae* je s podporou vysokých bootstrapů přiřazena k myxozoiám *S. elegans*, *S. truttae* a *Leptotheca fugu*, které tvoří samostatnou větev *Sphaerospora sensu stricto* (Jirků a kol. 2007). Podle jiné analýzy jsou *S. elegans* a *S. truttae* zařazeny k *Ceratomyxa sparusaurati* (Holzer a kol. 2004). Tato analýza však není podporována dalšími pracemi (Fiala 2006; Jirků a kol. 2006),

kteřé řadí tyto druhy rodu *Sphaerospora* do samostatné linie. *S. ranae* je blízce příbuzná se *S. elegans* a *S. truttae*. Tento blízký vztah je kromě fylogenetické analýzy dán i přítomností dvou oblastí s velkými inzerty v sekvencích SSU rDNA. Dále je zde i velká podobnost co se týče morfologie, lokalizace v hostiteli a sladkovodního výskytu (Jirků a kol. 2007).

Všechny čtyři dostupné sekvence druhů rodu *Cystodiscus* podle Hartigan a kol. (2012) tvoří monofyletickou skupinu s vysokou bootstrapovou podporou (Obr. 3). Skupina *Cystodiscus* spp. je v této analýze zařazena do skupiny sladkovodních myxozoí parazitujících ve žlučníku (podle Fiala 2006). K této skupině je zařazeno i *Soricimyxum fegati* z rejska (*Sorex araneus*), který je doposud jediným druhem parazitujícím v suchozemském obratlovcí (Dyková a kol. 2007).



Obr. 3: Fylogenetická pozice *Cystodiscus* spp. ve větvi sladkovodních myxozoí. (Převzato Hartigan a kol. 2012)

Předložená práce si klade za cíl zejména rozšířit velmi malé spektrum molekulárně-taxonomicky charakterizovaných myxozoí z obojživelníků a fylogenetickou analýzou vyhodnotit jejich původ a vzájemnou příbuznost.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je:

- 1) Amplifikovat a sekvenovat SSU rDNA u vybraných druhů myxosporeí z obojživelníků různých geografických oblastí.
- 2) Pitvou obojživelníků získaných z přímých importů se pokusit v jejich tkáních nalézt parazitující Myxosporea.
- 3) Provést morfologickou a molekulární (SSU rDNA) charakterizaci nalezených myxosporeí.
- 4) Pokusit se druhově determinovat nalezená Myxosporea.
- 5) Zkonstruovat fylogenetické stromy na základě získaných dat.
- 6) Vyhodnotit příbuznost myxosporeí z obojživelníků v souvislosti s geografickým rozšířením hostitele, lokalizací v hostiteli a s fylogenetickou polohou rybích myxosporeí.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Většina vzorků myxosporeí určených k molekulárně-taxonomické analýze byla poskytnuta Mgr. Miloslavem Jirků, Ph.D., který je získal během zahraničních expedic zaměřených na výzkum parazitofauny obojživelníků a také díky spolupráci s Dr. Mutschmannem. Takto získaná Myxozoa pochází z hostitelů z různých geografických oblastí: Indonézie, Číny, Vietnamu, Tanzánie, Surinamu a USA (Tab. 2). Vzorek *Sphaerospora* sp. z *Lithobates catebeiana* z USA byl poskytnut Dr. Stephenem Atkinsonem (Oregon State University). Další vzorky jsem získala vlastní pitvou žab *Litoria infrafrenata* z Indonézie (Tab. 3).

Vyšetřované žáby *Litoria infrafrenata* a *Bombina orientalis* pocházely z přímého importu z Indonézie (Aquarium.cz). Celkem byly vyšetřeny čtyři jedinci *L. infrafrenata* a osm jedinců *B. orientalis*. Jednotlivé orgány a tkáně (ledviny, játra, žlučový měchýř, varlata, svalovina, střevo, mozek a krev) byly vyšetřovány pomocí kompresních preparátů. Před jejich zhotovením byly všechny tkáně prohlédnuty, aby se zjistily případné makroskopické změny působené parazity. Preparáty se prohlížely ve světelném mikroskopu Olympus BH-2. V případě nálezu myxosporeí byly ve světelném mikroskopu BX 60 s fotozařizováním dokumentovány spory popřípadě vývojová stádia parazitů. Tkáně byly také fixovány pro histologické vyšetření a spory pro skanovací elektronovou mikroskopii. Poskytnuté vzorky byly fixovány etanolem pro izolaci DNA.

Vzorky pro histologické vyšetření byly fixovány ve fixačním roztoku podle Davidsona a dále byly uchovávány v jeho zásobním roztoku. Materiál byl zpracován klasickou parafínovou metodou na Parazitologickém ústavu v laboratoři rybí protistologie.

Tab. 2: Seznam vyšetřovaných žab.

| OZNAČENÍ | HOSTITEL | PŮVOD | MYXOZOA | ORGÁN |
|-----------|-----------------------------|-----------|----------------------|---------|
| LI01 | <i>Litoria infrafrenata</i> | Indonézie | - | - |
| LI02 | <i>Litoria infrafrenata</i> | Indonézie | <i>Myxobolus</i> sp. | varlata |
| LI03 | <i>Litoria infrafrenata</i> | Indonézie | <i>Myxidium</i> sp. | žlučník |
| LI04 | <i>Litoria infrafrenata</i> | Indonézie | <i>Myxobolus</i> sp. | varlata |
| BO01 - 08 | <i>Bombina orientalis</i> | Indonézie | - | - |

Tab. 3: Seznam poskytnutých vzorků k molekulárně-fylogenetické analýze.

| OZNAČENÍ | HOSTITEL | ORGÁN | PŮVOD | ZÍSKANÁ MYXOZOA |
|----------|-----------------------------------|---------|-----------|-------------------------|
| FM01 | <i>Phrynoidis aspera</i> | žlučník | Indonézie | - |
| FM02 | <i>Leptobrachium chapaense</i> | žlučník | Indonézie | <i>Myxidium</i> sp. |
| FM03 | <i>Brachytarsophrys carinense</i> | žlučník | Tanzánie | <i>Myxidium</i> sp. |
| FM04 | <i>Pipa pipa</i> | žlučník | Surinam | - |
| FM05 | <i>Hylarana signata</i> | ledvina | Indonézie | - |
| FM06 | <i>Hylarana signata</i> | žlučník | Indonézie | - |
| FM07 | <i>Hylarana signata</i> | žlučník | Indonézie | <i>Myxidium</i> sp. |
| FM08 | <i>Hyla cinera</i> | žlučník | USA | - |
| FM09 | <i>Ptychadena anchietae</i> | ledvina | Tanzanie | <i>Sphaerospora</i> sp. |
| FM10 | <i>Liua shihi</i> | žlučník | Čína | <i>Myxidium</i> sp. |
| FM11 | <i>Microhyla pulchra</i> | žlučník | Indonézie | <i>Myxidium</i> sp. |
| VNH 130 | <i>Fejervarya limnocharis</i> | žlučník | Vietnam | - |
| VNH 132 | <i>Fejervarya limnocharis</i> | žlučník | Vietnam | - |
| VNH 158 | <i>Hoplobatrachus rugulosus</i> | žlučník | Vietnam | - |
| VNH 168 | <i>Polypedates leucomystax</i> | žlučník | Vietnam | <i>Myxidium</i> sp. |
| VNH 48 | <i>Duttaphrynus melanostictus</i> | žlučník | Vietnam | - |
| VNH 53 | <i>Duttaphrynus melanostictus</i> | žlučník | Vietnam | - |
| VNH 133 | <i>Duttaphrynus melanostictus</i> | žlučník | Vietnam | - |
| 11M15 | <i>Lithobates catebeiana</i> | ledvina | USA | <i>Sphaerospora</i> sp. |

3.2. Příprava vzorků pro skanovací elektronový mikroskop (SEM)

Spory byly fixovány v 2,5 % glutaraldehydu v kakodylátovém pufru po dobu minimálně dvou hodin. Myxospory se pro SEM nanosly na krycí sklíčka. Nejdříve se alkoholem sklíčka přečistila a pak umístila do Petriho misky. Doprostřed krycího sklíčka se nanosla kapka (cca 25 μ l) polylysinu a nechala se částečně zaschnout v termostatu. Mezi tím se vzorek v glutaraldehydu s kakodylátovým pufrům centrifugoval 5 min/10 000 otáček za minutu, poté se odsála tekutina a mikroskopická se vzorkem se doplnila vypíracím roztokem. Složení vypíracího roztoku je 50 ml zásobního roztoku a 50 ml glukózy (2,7 g v 50 ml destilované vody). Vzorek s tímto roztokem se opět centrifugoval a tento krok se

opakoval třikrát. Po třetím stočení se odsál všechn vypírací roztok a v digestoři se přidaly dvě kapky 2% OsO₄. Vzorek se naněsl na krycí sklíčka s polylysinem, na kterém ulpěl vzorek a nechal se dvě hodiny fixovat. Po fixaci se opatrně odsála tekutina a naněsly se dvě kapky vypíracího roztoku. Po 15 minutách se tento krok opakoval a to celé třikrát. Z filtračního papíru se poskládala harmonika, do které se vložilo sklíčko se vzorkem. Vzorek se vložil na 15 min do 30% acetonu. Poté se aceton odsál a harmonika se vzorkem se zalila 50% acetonem. Tato acetonová řada na odvodnění vzorku pokračovala 70%, 80%, 90%, 95% a 100% acetonem, který se vyměňoval po 15 minutách. Poté se vzorek dal vysušit na dvě hodiny do CPD (Critical Point Device) (42°C 120 Ba kapalného CO₂ + plyn CO₂). Po vysušení se sklíčko nalepilo na terčíky, aplikovalo se několik kapek stříbra a pokovilo se.

Pokovené vzorky se prohlížely na skanovacím elektronovém mikroskopu JEOL JSM 7401F v laboratoři elektronové mikroskopie. Před prohlížením se nastavily parametry 3kV, GB-L a pracovní vzdálenost (WD) byla 8 mm.

3.3. Izolace DNA

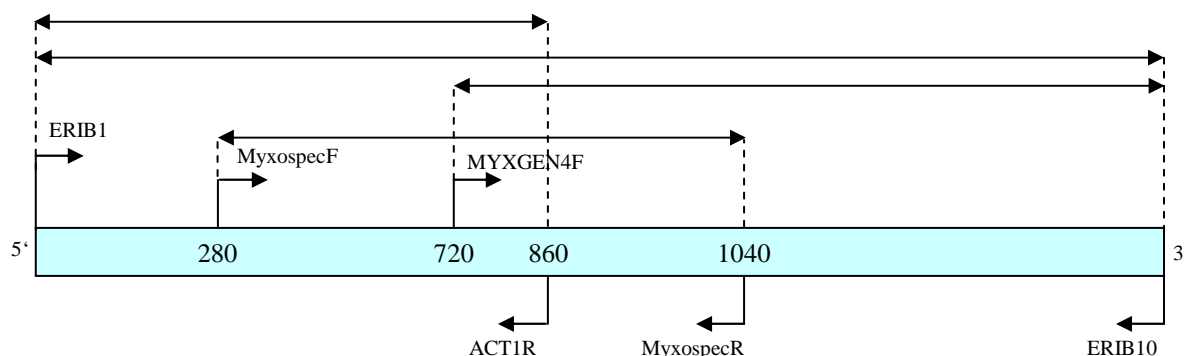
DNA byla izolována fenol-chloroformovou metodou. Vzorky, které byly uchovány v etanolu se zcentrifugovaly, odpipetoval se etanol a jeho zbytky se odstranily vysušením při teplotě 37°C. Po té, co byl vzorek bez etanolu, se přidalo 400 µl TNES-urea pufru (10 mM Tris, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA-2Na, 0,5% SDS, 4 M urea) a 4 µl proteinkinázy K. Směs byla inkubována při teplotě 60°C přes noc (minimálně 16 hod). Po inkubaci se přidalo 400 µl fenolu. Následovalo 5 minutové míchání opatrným otáčením zkumavky. Pak se vzorek centrifugoval 10 minut při 9000 otáčkách za minutu. Do nové mikrozkuhavky se opatrně odebrala vrchní fáze a přidalo se 400 µl fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1). Po pětiminutovém otáčení se mikrozkuhavka 10 min centrifugovala při 9000 otáčkách za minutu. Poté se opět odebrala vrchní fáze a přidalo se 400 µl chloroform:isoamylalkohol (24:1) a postup promíchání, centrifugace a odebrání vrchní fáze se zopakoval. DNA byla vysrážena pomocí přidání 800 µl 100% etanolu. Po rychlém promíchání otáčením se vzorek centrifugoval při 4°C 10 minut při maximální rychlosti. Po centrifugaci se rychle odsála tekutina a k peletu se přidalo 800 µl 70% etanolu. Po pětiminutové centrifugaci při 4°C se odebral etanol a pelet se vysušil při 37°C. DNA byla rozpuštěna ve 100 µl vody.

3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro získání PCR produktů byla použita strategie nested PCR (Obr. 4). Při první PCR byla použita kombinace primerů ERIB1 – ERIB10. Při následné nested PCR byla kombinace primerů MYXGEN4F – ERIB10 a ERIB1 – ACT1R. Pokud se tyto primery správně nenašly byly použity myxospecifické primery MyxospecF – MyxospecR pro získání alespoň částečných sekvencí. U sekvencí *Sphaerospora sensu stricto* byly použity při nested PCR také specifické primery SphFrogSSU2F2448 – ERIB10 a SphFrogSSU2F2203 – ERIB10. Používané primery jsou uvedeny v tabulce 4 a obrázku 4.

Na jednu reakci PCR se smíchalo 2,5 µl 10x PCR pufru, 2 µl nukleotidů (250 µmol), 1 µl forward a revers primeru (10 pmol), 1 µl Taq purple polymerázy (Top-Bio), 1 µl vzorku DNA a doplnilo se 16,5 µl deionizované vody na celkový objem 25 µl. Po namíchání reakční směsi následovala amplifikace v termocyleru (Biometra). Počáteční denaturační teplota byla nastavena na 95°C/3 min, pak následovalo pět cyklů 94°C/1 min, 48°C/1 min a 72°C/1 min 45 s a 25 cyklů 94°C/1 min, 50°C/1 min a 72°C/1 min 45 s. Závěrečná inkubační teplota 72°C byla nastavena na 10 minut. Při nested PCR byly změněny pouze teploty 48°C a 50°C na teploty 50°C a 52°C.

Při použití Titanium PCR polymerázy (Clontech) byl celkový reakční objem pouze 10 µl a byl smíchán 1 µl pufru, 0,8 µl nukleotidů, 0,4 µl od každého primeru, 0,2 µl Titanium PCR polymerázy, 1 µl DNA a 6,2 µl vody. Tato polymeráza má jinou pracovní teplotu, proto musela být tato teplota upravena i v amplifikačním cyklu z původních 72°C u Taq polymerázy na 68°C pro titanium polymerázu.



Obr. 4: Pozice SSU primerů využívaných při amplifikaci myxosporeí.

Tab. 4: Použité primery.

| NÁZEV | SEKVENCE 5' → 3' |
|------------------|--------------------------|
| ERIB1 | ACCTGGTTGATCCTGCCAG |
| ERIB10 | CTTCCGCTGGTTCACCTACGG |
| MYXGEN4F | GTGCCTTGAATAAATCAGAG |
| ACT1R | AATTTACCTCTCGCTGCCA |
| Myxospec-F | TTCTGCCCTATCAACTWGTTG |
| Myxospec-R | GGTTTCNCDGRGGGMCCAAC |
| SphFrogSSU2F2448 | TCAGGCCGGATCATAATGTTGTGG |
| SphFrogSSU2F2203 | ACCCGTCGGTGGGAATCATG |
| M13F | GTAAAACGACGGCCAGT |
| M13R | GAAACAGCTATGACCATG |

Pro vizualizaci PCR produktů byla používána gelová elektroforéza s 1% agarózovým gelem. Ten se připravil smícháním 0,55 g agarózy a 55 ml 0,5x TAE pufru. Po projití varem v mikrovlnné troubě a zchlazení na cca 45°C se přidaly 3 µl ethidium bromidu (0,5 µg/ml), Roztok se nalil do připravené vaničky s hřebínky a nechal se ztuhnout při pokojové teplotě (cca 30 min). Po ztuhnutí se do první jamky dalo 5 µl 1 kb markeru a do dalších jamek se napipetovaly vzorky. Elektroforéza probíhala při napětí 70 V po dobu minimálně 30 minut. Výsledek se vyhodnotil pod UV světlem a zdokumentoval. Proužky DNA ve správné velikosti se vyřízly z gelu a vyizolovaly.

Izolace PCR produktu se prováděla pomocí kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid). Ke gelovým proužkům se přidalo 500 µl DF Buffer, zvortexovalo a 10 – 15 min inkubovalo při teplotě 55 – 60°C. Každé 2 – 3 min se obsah mikrozkušavky promíchal. Sestavila se kolonka, do které se přepipetovala zchládlá tekutina, která se poté centrifugovala 30 s při 8000 otáčkách za minutu. Proteklá tekutina se odstranila a do kolonky se přidalo 500 µl Wash Buffer a opět se centrifugovalo za stejných podmínek. Po opakované centrifugaci 2 min při maximálních otáčkách za minutu se kolonka přemístila do nové mikrozkušavky a přidalo se 50 µl deionizované vody a nechalo se 2 min inkubovat při pokojové teplotě. Po centrifugaci 2 min při maximálních otáčkách byl získán vyizolovaný PCR produkt.

3.5. Klonování a izolace plazmidové DNA

Ligace se prováděla pomocí kitu Qiagen PCR Cloning Kit. Namíchala se ligační směs, která se skládala ze 2 μl PCR produktu, 2,5 μl ligačního pufru a 0,5 μl vektoru. Tato ligační směs se nechala inkubovat 2 hodiny při 14°C.

Do ligační směsi se po inkubaci přidalo 100 μl kompetentních buněk DH5 α a zkumavka se inkubovala 10 min na ledu. Následoval teplotní šok po dobu 30 sekund ve vodní lázni o teplotě 42°C se zchlazením 2 min na ledu. Ke vzorku se přidalo 200 μl SOC media o pokojové teplotě a dal se vodorovně třepat na 1 hodinu při teplotě 37°C. Po třepání se obsah nanaslel na Petriho misky s X-galem a hokejkou se rovnoměrně rozetřel. Následovala inkubace ve 37°C přes noc (cca 16 hod).

Další den se provádělo testování úspěšnosti klonování. Špičkou se vypíchly z Petriho misky bílé kolonie a daly se do mikrozukavky s 30 μl vody. Pak se připravila PCR reakční směs s primery M13F a M13R, které nasedají na plazmidovou DNA. K reakční směsi se přidaly 2 μl buněčné suspenze. Amplifikace probíhala za následujících podmínek: 95°C/10 min, (95°C/50 s, 52°C/50 s, 72°C/1 min) 20x, 72°C/10 min.

Vzorky, které PCR test označil za úspěšně klonované, byly dále namnoženy. Do 3 ml LB media se přidalo 12 μl ampicilinu a zbytek bakteriální suspenze. Zkumavky s bakteriální suspenzí se daly třepat při teplotě 37°C přes noc.

Izolace plazmidu se prováděla pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Namnožená bakteriální suspenze se zcentrifugovala a po odstranění zbytků media zůstal pouze pelet, který se rozsuspendoval ve 250 μl roztoku „Suspension Buffer“. Přidalo se 250 μl „Lysis Buffer“ a po promíchání převrácením se inkubovalo 5 min při pokojové teplotě. Pak se přidal 350 μl chlazeného roztoku „Binding Buffer“ a po promíchání se inkubovalo 5 min na ledu. Poté se dalo centrifugovat na 10 min při maximálních otáčkách. Sestavila se kolonka, do které se přelil supernatant a kolonka se centrifugovala 1 minutu. Proteklá tekutina se slila a přidalo se 700 μl roztoku „Wash Buffer II“ a centrifugovalo se 1 min při maximálních otáčkách. Opět se slila proteklá tekutina a kolonka se 1 minutu centrifugovala. Kolonka se vložila do nové mikrozukavky a přidalo se 60 μl vody. Po centrifugaci 1 minutu při maximálních otáčkách byla v mikrozukavce vyizolovaná plazmidová DNA.

3.6. Sekvenování

Sekvenace probíhala v servisní laboratoři genomiky BC AV ČR. DNA byla sekvenována po obou řetězcích pomocí univerzálních primerů M13F a M13R, které nasedají na plazmidovou DNA, anebo vhodných SSU primerů. Sekvenace byla provedena pomocí automatického sekvenátoru ABI PRISM 3130xl.

Vzorky na sekvenátor byly připravovány smícháním 7 µl PCR produktu a 0,5 µl příslušného primeru nebo pokud šlo o plazmid tak smícháním 0,5 µl primeru (M13F nebo M13R), plazmidové DNA v rozmezí 75 – 150 ng/µl naměřené na spektrofotometru a doplněno deionizovanou vodou na objem 7,5 µl.

3.7. Fylogenetická analýza

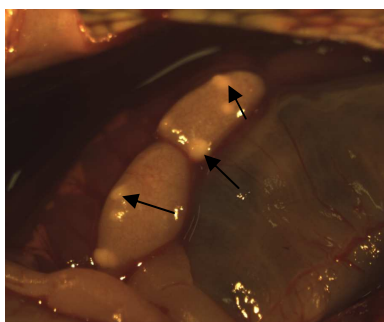
Sekvenční data ze sekvenátoru byla kompletována v programu SeqMan (DNASTAR). Alignment byl sestaven ze získaných sekvencí a ze sekvencí uložených v genové bance (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvence byly uspořádány v programu MAFFT verze 6.864 (Katoh a kol. 2005) metodou L-INS-i. Z alignmentu byly vybrané konzervativní části pomocí programu Gblocks 0.91.b (Castresana 2000).

Fylogenetická analýza byla provedena metodou maximální pravděpodobnosti (ML - maximum likelihood) a metodou maximální úspornosti (MP – maximum parsimony). K těmto analýzám byly používány programy RAxML 7.0.3. (Stamatakis 2006) model GTRGAMMA a PAUP 4.0b10 (Swofford a kol. 2001). Bootstrapová analýza byla stanovena s pěti sty opakováními. Fylogenetické stromy byly zobrazeny v programu TreeView 32 (Page 1996) a na úpravu byl použit program Adobe Illustrator 10 CE.

4. Výsledky

4.1. Morfologická dokumentace

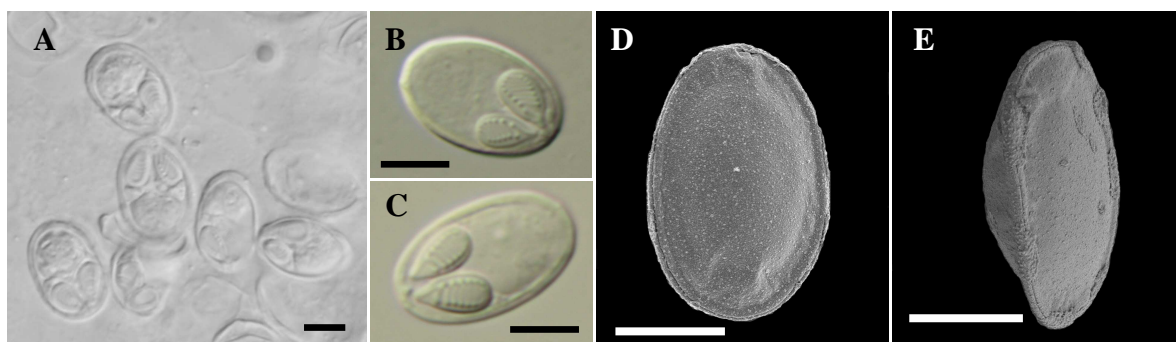
Preparáty z tkání žab *Bombina orientalis* a *Litoria infrafronata* byly vyšetřeny světelným mikroskopem. U osmi jedinců *B. orientalis* nebyly nalezeny v tkáních žádné spory prokazující přítomnost myxosporeí. Ve žlučníku jednoho jedince žáby *L. infrafronata* byly objeveny spory *Myxidium* sp. a u dvou byla infikovaná varlata druhem *Myxobolus* sp.



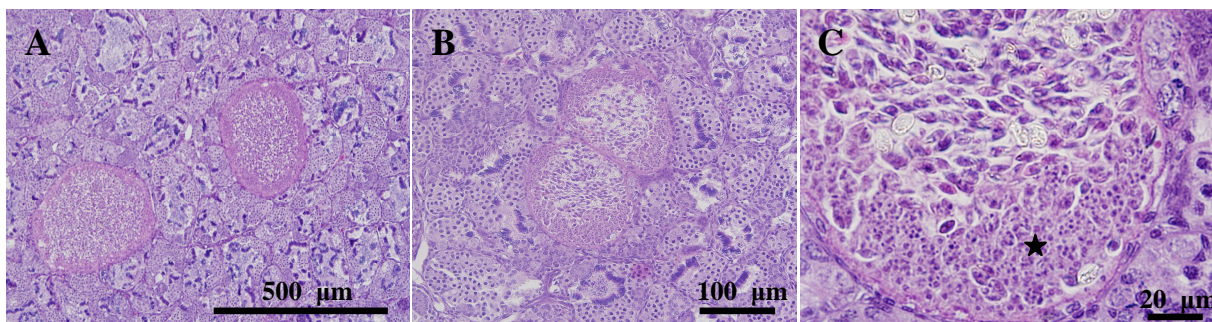
Obr. 5: Makroskopická plasmodia ve varlatech *Litoria infrafronata* pod binolupou.

U dvou jedinců *L. infrafronata* byly pozorovány pouhým okem viditelné makroskopická plasmodia (Obr. 5). Roztlakový preparát tkáně potvrdil přítomnost myxospor rodu *Myxobolus* (Obr. 6A). Spory jsou oválné, 13 (10 – 14,5) μm dlouhé a 8,5 (7 – 9) μm široké. Pólové váčky jsou kapkovitého tvaru a jejich rozměry jsou 5,1 x 2,9 μm . U některých spor se jevil jeden pólový váček nepatrně menší. Uvnitř váčku stočené pólové vlákno vytváří spirálu se sedmi závity (Obr. 6B, C). SEM potvrzuje oválný tvar spor *Myxobolus* sp. Spory tvoří dvě stejné chlopně a jejich povrch je hladký (Obr. 6D, E).

Na histologických řezech byla dokumentována polysporická plasmodia se zralými sporami (Obr. 7A) a také plasmodia s vyvíjejícími se sporami (Obr. 7B, C). Velikost plasmodií se pohybovala okolo 0,5 mm.



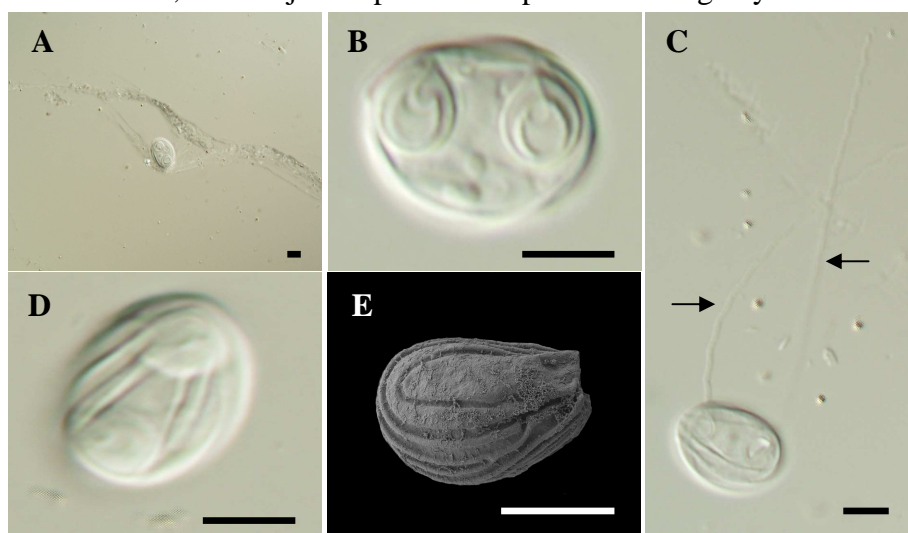
Obr. 6: Spory *Myxobolus* sp. z *Litoria infrafronata*. **A – C** Nomarského DIC. **A** – Shluk spor ve tkáni. **B,C** – Detail spory – tvar pólových váčků a charakter vinutí pólového vlákna. **D,E** – Povrch spory znázorněný pomocí SEM. Uvedená měřítka odpovídají velikosti 5 μm .



Obr. 7: Histologické řezy varlat *Litoria infrafronata* infikované *Myxobolus* sp. **A** – Dvě polysporická plasmodia obsahující zralé spory. **B** – Polysporické plasmodium s nezralými sporami na okraji. **C** – Detail předchozího snímku, hvězdička označuje místo s nezralými sporami.

Oproti velkému množství spor *Myxobolus* sp. v cystách, se v síťovitých plasmodiích (Obr. 8A) druhu *Myxidium* sp. myxospory vyskytovaly v menší míře. Velikost spor je 10,8 x 7,5 (10 – 11,5 x 6,5 – 8,5) µm. Jednotlivé spory jsou oválné se dvěma pólovými váčky, které jsou téměř kulaté (3,9 (3,5 – 4,5) x 4,3 (4 – 4,5) µm) a umístěny na opačných pólech s vyústěním na stejné straně spory (Obr. 8B). Vystřelené pólové vlákno má délku přibližně 40 – 50 µm (Obr. 8C). Povrch spory není hladký, žebrování je zřetelné již ve světelném mikroskopu (Obr. 8D). Skanovací elektronový mikroskop odhalil charakter žebrování i počet 6 – 8 rýh na jedné chlopni (Obr. 8E).

Ostatní Myxosporaea podrobená fylogenetické analýze byla k dispozici pouze jako vzorky pro izolaci DNA, a tak nejsou v předložené práci morfologicky dokumentovány.



Obr. 8: Spory *Myxidium* sp. z *Litoria infrafronata*. **A** – D Nomarského DIC. **A** – Uložení spory v plasmodiu. **B** – Spora s detailem na vyústění pólových váček a na charakter vinutí pólového vlákna. **C** – Vystřelená pólová vlákna. **D** – Spora se zaostřením na povrch. **E** – Povrch spory znázorněný pomocí SEM. Uvedená měřítka odpovídají velikosti 5 µm.

4.2. Sekvenční a fylogenetická analýza

Ze vzorků, které byly k dispozici, se podařilo osekvenovat jedenáct celých nebo alespoň částečných SSU rDNA z myxozoi obojživelníků z různých geografických oblastí (Tab. 5). Těchto jedenáct SSU rDNA sekvencí tvořilo a) sedm sekvencí *Myxidium* sp. pocházejících ze žlučníků hostitelů z Indonézie, Tanzánie, Vietnamu a Číny, b) dvě sekvence *Myxobolus* sp. z varlat žáby *Litoria infrafrenata* z Indonézie a c) dvě sekvence druhů zařazených do rodu *Sphaerospora* z ledvin žab z Tanzánie a USA. Za účelem zjištění fylogenetické příbuznosti studovaných myxozoi byly k těmto sekvencím z Genové banky přidány vybrané sekvence myxozoi parazitujících u obojživelníků a ryb a byly sestaveny fylogenetické stromy.

Tab. 5: Získané sekvence.

| HOSTITEL | MYXOZOA | ZÍSKANÁ DÉLKA SSUrDNA (bp) | KOMBINACE PRIMERŮ |
|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| <i>Polypedates leucomystax</i> | <i>Myxidium</i> sp. | 822 | MyxospecF – MyxospecR |
| <i>Litoria infrafrenata</i> | <i>Myxidium</i> sp. | 929 | MyxospecF – MyxospecR |
| <i>Microhyla pulchra</i> | <i>Myxidium</i> sp. | 928 | MyxospecF – MyxospecR |
| <i>Hylarana signata</i> | <i>Myxidium</i> sp. | 1653 | MyxospecF – ERIB10 |
| <i>Liua shihi</i> | <i>Myxidium</i> sp. | 1248 | ERIB1 – ACT1R |
| <i>Brachytarsophrys carinense</i> | <i>Myxidium</i> sp. | 1419 | ERIB1 – MyxospecR |
| <i>Leptobrachium chapaense</i> | <i>Myxidium</i> sp. | 2000 | ERIB1 – ERIB10 |
| <i>Litoria infrafrenata</i> | <i>Myxobolus</i> sp. | 1899 | ERIB1 – ERIB10 |
| <i>Litoria infrafrenata</i> | <i>Myxobolus</i> sp. | 1918 | ERIB1 – ERIB10 |
| <i>Ptychadena anchietae</i> | <i>Sphaerospora</i> sp. | 2592 | ERIB1 – ERIB10 |
| <i>Lithobates catebeiana</i> | <i>Sphaerospora</i> sp. | 2687 | ERIB1 – ERIB10 |

Na obrázku 9 je znázorněn fylogenetický strom, ve kterém je analyzováno sedm získaných myxozoi rodu *Myxidium*, které podle fylogenetické analýzy odpovídají čtyřem druhům. Všechny tyto sekvence tvoří monofyletickou skupinu blízce příbuznou monofyletické skupině *Cystodiscus* s podporou maximálního bootstrapu. K těmto skupinám

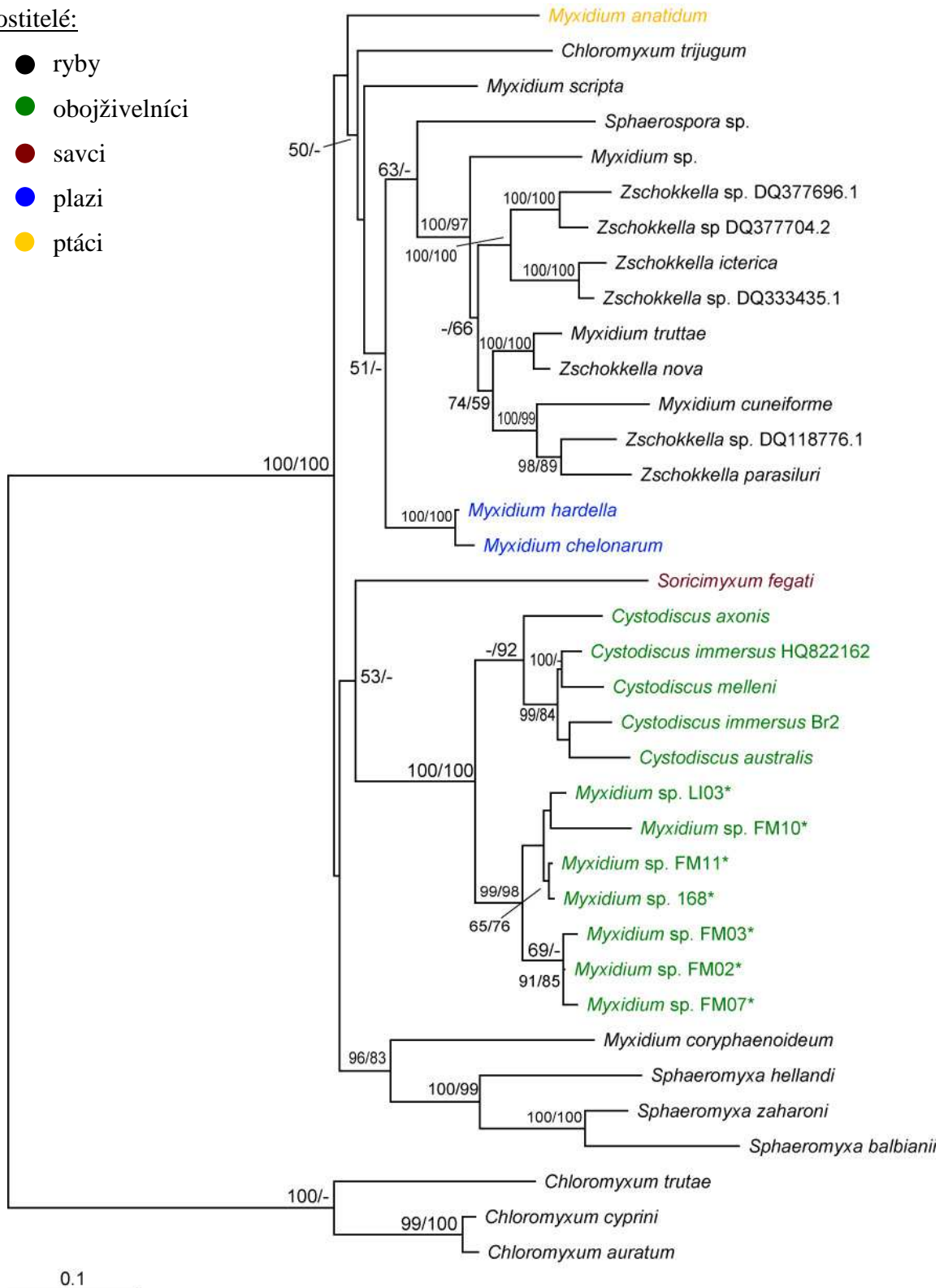
je přiřazeno i *Soricimyxum fegati* z rejska, ale s malou bootstrapovou podporou. Tyto sekvence z obojživelníků tvoří v subkladu sladkovodní *Myxidium* samostatnou skupinu.

Sekvence *Myxobolus* sp. LI02 a *Myxobolus* sp. LI04 získané z *Litoria infrafronata* jsou ve fylogenetické analýze připojeny k sobě s podporou maximálního bootstrapu (Obr. 10) a jsou sekvencně 100% homologické. S podporou 100% bootstrapu jsou tyto dvě sekvence přiřazeny ke skupině sekvencí *Myxobolus* do které patří *M. cyprini*, *M. pseudodispar*, *M. musculi*, *M. terengganuensis*, *Myxobolus* sp., *M. stanlii*, *M. bartai* a *M. artus*.

Rod *Sphaerospora* je polyfyletický a předběžná BLAST analýza neodhalila blízkou příbuznost ke konkrétní skupině myxozoí, proto se konstruoval fylogenetický strom, který zahrnuje kromě skupiny *Sphaerospora sensu stricto* ještě zástupce z mořské a sladkovodní větve. Skupina *Sphaerospora sensu stricto* obsahuje v současné době pět druhů rodu *Sphaerospora* plus druhy *Leptotheca fugu* a *Bipteria formosa*. Kromě *Sphaerospora ranae*, která pochází z obojživelníka, jsou zbylé sekvence myxosporeí z rybích hostitelů. Sekvence *S. dicentrarchi*, *S. testicularis* a *Sphaerospora* sp. jsou zařazeny do mořské větve a *S. monari*, *Sphaerospora* sp. a *S. oncorhynchi* jsou ve sladkovodní větvi. Analýza odhalila, že *Sphaerospora* sp. FM09 a *Sphaerospora* sp. 11M15 jsou blízce příbuzné k jediné sekvenci z obojživelníka *Sphaerospora ranae* v rámci *Sphaerospora sensu-stricto* s vysokou bootstrapovou podporou (Obr. 11).

Hostitelé:

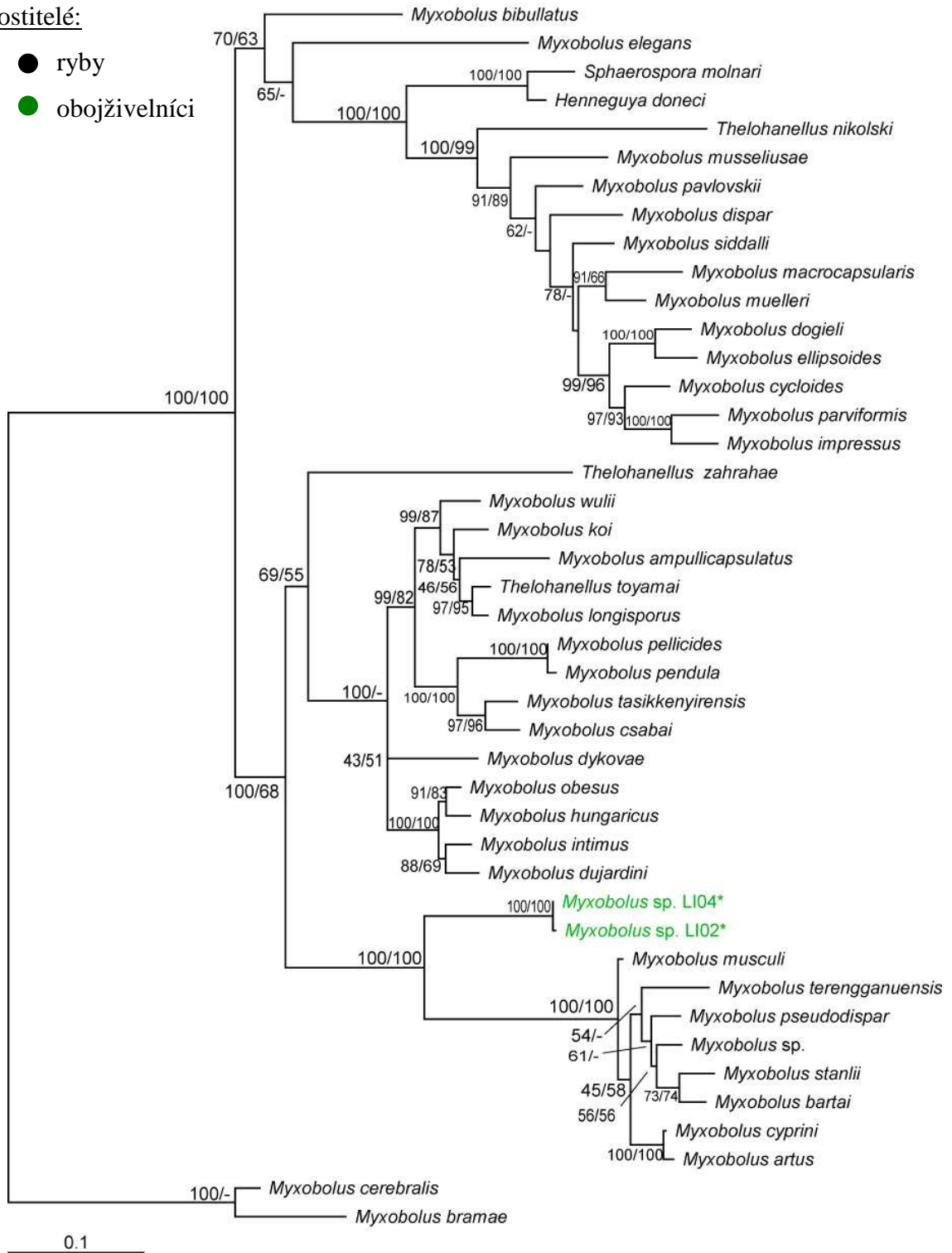
- ryby
- obojživelníci
- savci
- plazi
- ptáci



Obr. 9: Fylogenetický strom skupiny „*Myxidium*“ konstruovaný metodou maximální pravděpodobnosti v programu RAxML. Nově získané sekvence jsou označeny hvězdičkou. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů ML/MP vyšší než 50%. Měřítko délky větví je uvedeno pod stromem. Jako outgroup byly vybrány tři sekvence rodu *Chloromyxum*.

Hostitelé:

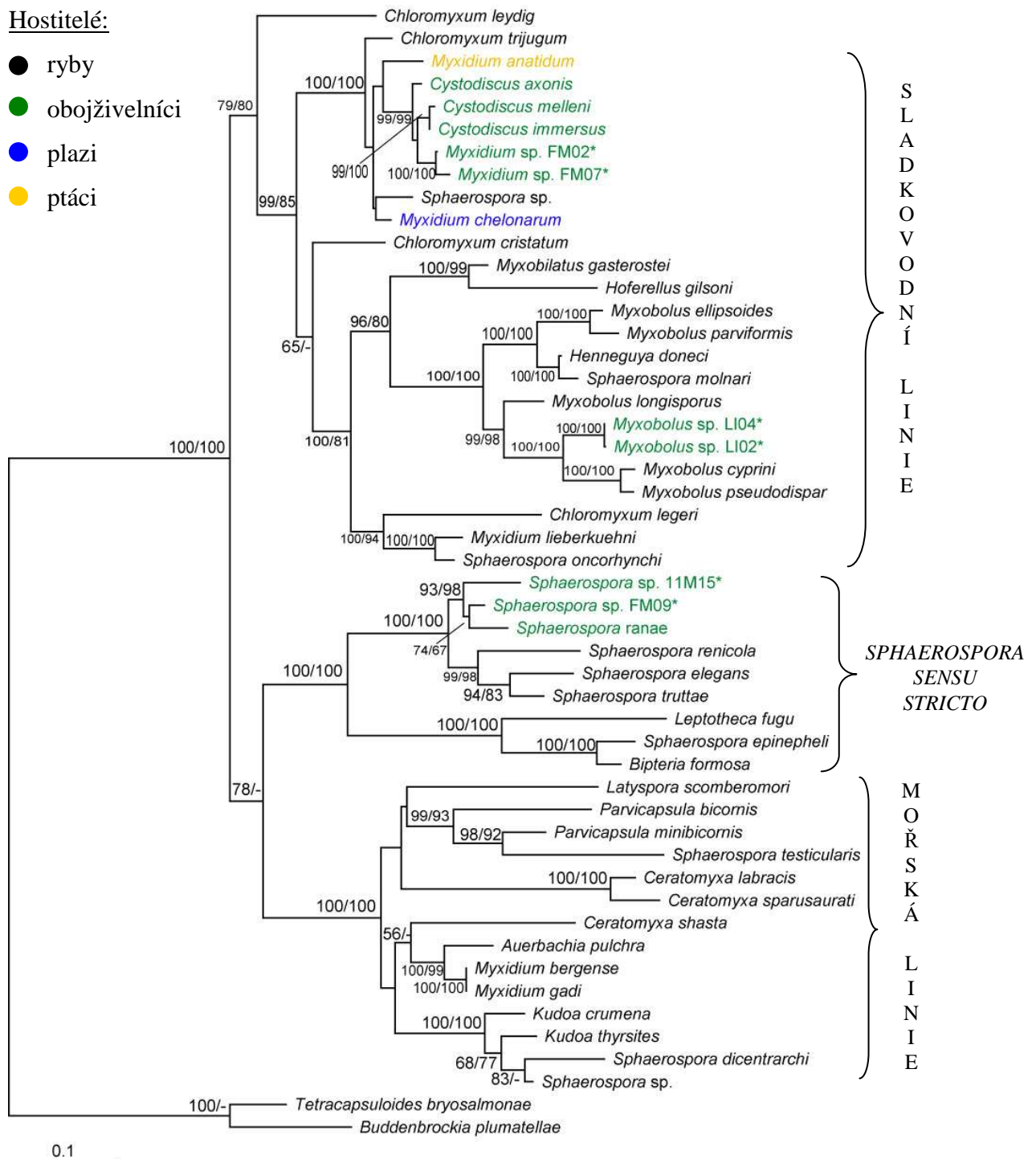
- ryby
- obojživelníci



Obr. 10: Fylogenetický strom skupiny „*Myxobolus*“ konstruovaný metodou maximální pravděpodobnosti v programu RAxML. Hvězdičkou jsou označeny nové a jediné sekvence z obojživelníků. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů ML/MP vyšší než 50%. Měřítko délky větví je uvedeno pod stromem. *Myxobolus cerebralis* a *Myxobolus bramae* byly vybrány jako outgroup.

Hostitelé:

- ryby
- obojživelníci
- plazi
- ptáci



Obr. 11: Fylogenetický strom konstruovaný metodou maximální pravděpodobnosti v programu RAxML. Nově získané sekvence jsou označeny hvězdičkou a za outgroup byly vybrány *Tetracapsuloides bryosalmonae* a *Buddenbrockia plumatellae*. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů ML/MP vyšší než 50%. Měřítko délky větví je uvedeno pod stromem.

5. Diskuze

5.1. Fylogenetické vztahy

Dosud je známo jen velice málo SSU rDNA sekvencí myxozoi z obojživelníků. V genové bance jsou dostupné pouze čtyři sekvence rodu *Cystodiscus* (*C. immersum*, *C. melleni*, *C. australis* a *C. axonis*), jedna sekvence *Sphaerospora ranae* a jedna *Chloromyxum careni*. Dosud není známá žádná SSU rDNA sekvence druhů rodu *Myxobolus* popsanych z obojživelníků. V této práci se podařilo získat sedm nových sekvencí rodu *Myxidium*, dvě rodu *Myxobolus* a dvě rodu *Sphaerospora*.

Rod *Myxidium* je fylogeneticky velmi různorodý. Důkazem toho je i to, že druhy zařazené do rodu *Myxidium* u nově fylogeneticky determinované monofyletické skupiny obojživelníčních myxozoi (Hartigan a kol. 2011) byly posléze přerazeny do nově ustanoveného rodu *Cystodiscus* (Hartigan a kol. 2012). Tyto druhy rodu *Cystodiscus* se kromě fylogenetické příbuznosti vyznačují i velmi podobnou morfologií spory a samozřejmě parazitací specifického hostitele – obojživelníka. Sedm sekvencí myxosporeí morfologicky odpovídající charakteristice rodu *Myxidium* získaných v předložené magisterské práci tvoří také samostatnou a monofyletickou skupinu podpořenou vysokými bootstrapy. Obě dvě zmíněné monofyletické skupiny myxozoi obojživelníků jsou spojeny za podpory maximálního bootstrapu a vytváří jednu rozsáhlou linii myxozoi z obojživelníků. Na základě fylogenetické analýzy předpokládáme, že získané sekvence odpovídají jednotlivým čtyřem samostatným druhům.

V této době je popsáno pět druhů rodu *Myxobolus*, ale zatím není dostupná ani jedna sekvence v genové bance. V předložené práci dvě nově získané sekvence byly ve fylogenetickém stromě přiřazeny k sobě s podporou stoprocentního bootstrapu. Jejich homologie je stoprocentní, proto není pochyb, že vzorky LI02 a LI04 představují totožný druh. Kvůli nedostatku molekulárních dat není dosud jasné, zda Myxozoa rodu *Myxobolus* parazitující u obojživelníků budou tvořit samostatnou linii jako je tomu u rodu *Myxidium* + *Cystodiscus*.

Podobná situace je i u rodu *Sphaerospora*, kde je v genové bance dostupná pouze sekvence *S. ranae*. V této práci byly ve fylogenetické analýze nové sekvence *Sphaerospora* sp. FM09 a *Sphaerospora* sp. 11M15 přiřazeny jako sesterské k této jediné myxozoi sekvenci z obojživelníka. Tato skupina žabích myxozoi je ve stejné linii s *Leptotheca fugu*,

Bipteria formosa, *S. truttae* a *S. elegans*. Podle analýzy Holzer a kol. (2004) jsou *S. truttae* a *S. elegans* blízce příbuzné k *Ceratomyxa sparuaaurati* s poměrně vysokým bootstrapem. Avšak práce Jirků a kol. (2006; 2007) a Fiala (2006) řadí *S. truttae* a *S. elegans* jako samostatnou skupinu jako je tomu i v naší analýze. Do této analýzy byly zahrnuty všechny dostupné sekvence *Sphaerospora* z genové banky, které jsou zařazeny napříč všech linií. Skupina žabích myxozoí s morfologií rodu *Sphaerospora* je zařazena do linie *Sphaerospora sensu stricto*, která v provedené analýze spadá jako sesterská k mořské linii myxozoí. Délka nových sekvencí je extrémních 2592 a 2687 bp a tomu odpovídá i délka jediné téměř kompletní sekvence *S. truttae*, která má 2541 bp (Holzer a kol. 2004).

5.2. Determinace nalezených druhů

Všechna nově sekvenčně charakterizovaná Myxozoa pochází z hostitelů z různých geografických oblastí jako je Indonézie (6x), Tanzánie (2x), Vietnam (1x), Čína (1x) a USA (1x). Jedna ze získaných myxozoí pochází z mloka *Liua shihi* z Číny a zbytek pochází z žab. *Myxidium* sp. z mloka je zároveň první molekulárně charakterizovaný druh myxozoí z ocasatého obojživelníka. Všechna nalezená Myxozoa postihovala charakteristický orgán. Myxozoa rodu *Myxidium* byla nalezena ve žlučníku, druh rodu *Myxobolus* infikoval varlata a v ledvinách byla nalezena Myxozoa rodu *Sphaerospora*. Morfologická dokumentace ve světelném a skanovacím elektronovém mikroskopu byla provedena pouze u vzorků *Myxobolus* sp. a *Myxidium* sp. z *Litoria infrafrenata* z Indonézie, které byly přímo k dispozici po pitvě jejich hostitelů. Druhové determinaci jsem se věnovala tedy pouze u těchto nálezů.

Myxidium sp. LI03 se od ostatních druhů rodu *Myxidium* popsaných u obojživelníků liší jak rýhováním na povrchu spory tak zejména polohou pólových váčků. Rýhy u *Myxidium* sp. LI03 jsou do půlkruhu narozdíl od ostatních, které mají toto rýhování spíše vodorovné, příčné nebo jsou hladké. Pólové váčky jsou sice umístěny na opačných pólech spory, jako je tomu u ostatních spor rodu *Myxidium*, ale póry pro vystřelování pólových vláken jsou většinou na opačných stranách nebo přímo na pólech, kdežto u *Myxidium* sp. LI03 jsou na jedné straně. Velikostí spor je nejbližší k *M. typhonius*, který je rozdílný pouze o desetiny mikrometru (Gray 1993). Dále je se svou velikostí podobný k *M. haldari* (10,3 x 6,7 μm). Ostatní spory přesahují velikost 12 μm . Všechna dosud popsaná Myxozoa rodu *Myxidium* u obojživelníků byla nalezena ve žlučníku svého hostitele. Předpokládá se, že

Myxozoa parazitující u obojživelníků nejsou hostitelsky specifická (Delvinquier a kol. 1992, McAllister a Burse 2005). Dokazují to například hostitelé *M. immersum*, kteří se dají zařadit do šesti čeledí nebo *M. serotoninum*, které má hostitele dokonce z devíti čeledí (Eiras 2005). Geograficky je rod *Myxidium* velmi rozšířený.

Z uvedených údajů lze vyvodit, že nalezený druh myxozoí u *L. infrafronata* bude druhem pro vědu novým. Unikátní poloha pólových váčků a fylogenetická pozice bude pravděpodobně dostatečným podkladem pro ustanovení nového rodu myxozoí zastoupeným v této práci objeveným druhem.

Tvar spor *Myxobolus* sp. vzorků LI02 i LI04 je podobný známým sporám u druhů rodu *Myxobolus* z obojživelníků, kromě *M. bufonis*, který má narozdíl od ostatních kulaté spory (Upton 1992) a *M. ranae*, který má kapkovitý tvar (Guyenot a Naville 1922). *M. hylae* se může vyskytovat ve dvou typech – oválný a kulatý. Oválné spory jsou svými rozměry 14,2 x 9,1 µm větší (Browne 2002). Podle velikosti jsou spory v magisterské práci studovaného druhu nejbližší k *M. fallax*, které mají velikost 13,4 x 9,5 µm a *M. chimbuensis* s velikostí 11,9 x 8,4 µm (Browne 2002, Ewers 1973). Ostatní dosud známé spory jsou rozměrově menší (Browne a kol. 2002). Myxozoa rodu *Myxobolus* z obojživelníků parazitují ve varlatech. Jedinou výjimkou je *M. ranae* parazitující na kůži (Guyenot a Naville 1922). Pravděpodobnost, že studovaný druh je *M. fallax* nebo *M. chimbuensis* je vysoká a to díky hostiteli, kterým jsou žáby ze stejného rodu *Litoria*. I geografická lokalizace je poměrně blízká. *M. fallax* byl popsán v Austrálii a *M. chimbuensis* na Papui Nové Guinei. Jak jsou tyto druhy blízce příbuzné a jestli by mohlo jít dokonce o totožné druhy nelze nyní s určitostí zjistit, protože dosud nejsou známy sekvence těchto dvou popsaných druhů rodu *Myxobolus*.

6. Závěr

1. Podařilo se získat celkem jedenáct sekvencí myxosporeí z obojživelníků: sedm sekvencí *Myxidium* sp., dvě sekvence *Myxobolus* sp. a dvě sekvence *Sphaerospora* sp.
2. Získané sekvence druhů rodu *Myxidium* sp. odpovídají podle fylogenetických analýz čtyřem druhům, které jsou pro vědu druhy nové.
3. Unikátní morfologie spor a fylogenetická pozice druhů zařazených nyní do rodu *Myxidium* bude v budoucnosti podkladem pro ustanovení nového rodu.
4. Sekvence *Myxobolus* sp. z *Litoria infrafronata* je první sekvence získaná u druhu rodu *Myxobolus* z obojživelníků.
5. Byly získány první kompletní sekvence dvou druhů *Sphaerospora* spp. z obojživelníků.
6. Byla provedena morfologická dokumentace na úrovni světelné a elektronové mikroskopie u druhů *Myxidium* sp. a *Myxobolus* sp. z *Litoria infrafronata* z Indonézie.
7. Získaná data budou součástí tří vědeckých článků.

7. Seznam literatury

- ANDERSON C. L., CANNING E. U., OKAMURA B. 1998: A triploblast origin for Myxozoa? *Nature*, 392: 346 – 347.
- 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.
- 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.
- BROWNE R. K., SCHELTINGA D. M., POMERING M., MAHONY M. 2002: Testicular myxosporidiasis in anurans, with a description of *Myxobolus fallax* n. sp. *Systematic parasitology*, 52: 97 – 110.
- 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. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 19: 203 – 206.
- CANNON Q., WAGNER E. 2003. Comparison of discharge mechanisms of cnidarian Cnidae and myxozoan polar capsules. *Reviews in Fisheries Science*, 11: 185 – 219.
- CASTRESANA J. 2000: Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 540 – 552.
- CHAKRAVATY M. M. 1940: Observations on two myxosporidians, *Zschokkella lissemysi* n. sp. from the gall bladder of the tortoise, *Lissemys punctatus* and *Zschokkella auerbachi* (Weill) from the gall bladder of *Bufo melanostictus*. *Proceedings of Indian Academy of Sciences*, 6: 69 – 74.
- DELVINQUIER B. L. J., MARCUS M. B., PASSMORE N. I. 1992: *Myxidium lesmiteri* n. sp. (Myxosporea, Myxididae) from the gallbladder of 3 Southern african anura. *Systematic parasitology*, 23: 25 – 30.
- DESSER S. S., LOM J., DYKOVÁ I .1986: Developmental stages of *Sphaerospora ohlmacheri* (Whineri, 1893) n. comb. (Myxozoa, Myxosporea) in the renal tubule of bullfrog tadpoles, *Rana catesbeiana*, from the Lake of Two Rivers, Algonquin Park, Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, 64: 2213 – 2217.
- DIAMANT A., LOM J., DYKOVA I. 1994: *Myxidium leei* n. sp., a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organism*, 20: 137 – 141.

- 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., LINDNER A., RAIKOVA E. V., COLLINS A. G., CARTWRIGHT P. 2008: Phylogenetic placement of the enigmatic parasite, *Polypodium hydriforme*, within the Phylum Cnidaria. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 139.
- EWERS W. H. 1973: *Myxobolus chimbuensis* n. sp. (family Myxobolidae; Cnidosporida; Protozoa) from the testes of the hylid frog *Litoria darlingtoni*, from New Guinea. *Science in New Guinea*, 1: 16 – 20.
- 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.
- 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
- GRAY M. E. 1993: A New Species of *Myxidium* (Myxozoa: Myxidiidae) from the Gall Bladders of Anuran Amphibians from Peru. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 96: 152 – 157.
- GUNTER N., ADLARD R. 2010: The demise of *Leptotheca* Thélohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Myxobolus* Bütschli, 1882 and *Sphaerospora* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Sphaerosporidae). *Systematic parasitology*, 75: 81 – 104.
- GUYENOT E., NAVILLE A. 1922: Sur une myxosporidie (*Myxobolus ranae* n. sp.) et une microsporidie parasites de *Rana temporaria*. *Revue Suisse de Zoologie*, 29: 413 – 425.
- HARTIGAN A., FIALA I., DYKOVA I., JIRKŮ M., OKIMOTO B., ROSE K., PHALEN D. N., ŠLAPETA J. 2011: A suspected parasite spill-back of two novel *Myxidium* spp. (Myxosporea) causing disease in Australian endemic frogs found in the invasive cane toad. *Plos One*, 6: e 18871.
- 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.

- HEDRICK R. P., EL-MATBOULI M., ADKISON M. A., MACCONNELL E. 1998: Whirling disease: re-emergence among wild trout. *Immunological Reviews*, 166: 365 – 376.
- HILL B. D., GREEN P. E., LUCKE H. A. 1997: Hepatitis in the green tree frog (*Litoria caerulea*) associated with infection by a species of *Myxidium*. *Australian Veterinary Journal*, 75: 910 – 911.
- HOLLAND J. W., OKAMURA B., HARTIKAINEN H., SECOMBES C.J. 2010: A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proceedings of the royal Society of Biological sciences*, 278: 546 – 553.
- 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.
- JIMENEZ-GURI E., PHILIPPE 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., JANOVIČ 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.
- JIRKŮ M., BARTOŠOVÁ P., KODÁDKOVÁ A., MUTSCHMANN F.. 2011: Another chloromyxid lineage: molecular phylogeny and redescription of *Chloromyxum careni* from the Asian Horned frog *Megophrys nasuta*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58: 50 – 59.
- JOHNSON T. H., BANCROFT M. J. 1918: A parasite, *Myxobolus hylae* n. sp., of the reproductive organs of the Golden Swamp Frog, *Hyla aurea*. *Journal of the Royal Society of New South Wales*, 43: 171 – 175.
- JOSEPH H. 1905: *Chloromyxum protei* n. sp. *Zoologischer Anzeiger*, 29: 450 – 451.
- KATO H., 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., 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. *Folia Parasitologica*, 41: 27 – 37.
- 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. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48: 395 – 413.
- KIM J., KIM W., CUNNINGHAM C. W. 1999: A new perspective on lower metazoan relationships from 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 423 – 427.
- KUDO R., SPRAGUE V. 1940: On *Myxidium immersum* (Lutz) and *M. serotinum* n. sp., two myxosporidian parasites of Salientia of South and North America. *Revista de Medicina Tropical y Parasitologia. Bacteriologia, Clinica y Laboratoria*, 6: 65 – 73.
- LI L. 1993: Notes on two new species of parasitic protozoa from *Rana Boulengeri* Günther (Zoomastigophores: Kinetoplastida: Trypanosomatidae; Myxosporea: Bivalvulida: Myxidiidae). *Acta Zootaxonomica Sinica*, 18: 385 – 388.
- LOM J., DYKOVÁ I. 2006: Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, 53: 1 – 36.
- LUTZ A. 1889: Ueber ein *Myxosporidium* aus der Gallenblase brasilianischer Batrachier. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 5: 84 – 88.
- McALLISTER CH. T., BURSEY CH. R. 2005: Endoparasites of the eastern narrowmouth toad, *Gastrophryne carolinensis* (Anura: Microhylidae), from Northwestern Louisiana and Northeastern Texas, U.S.A. *Comp. Parasitol.*, 72: 124 – 128.
- 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37: 185 – 193.
- MORRIS D. J. 2010: Cell formation by myxozoan species is not explained by dogma. *Proceedings of Royal Society of Biological sciences*, 277: 2565 – 2570.
- MUTSCHMANN F. 1999: A new myxozoan, *Chloromyxum careni* sp. n. (Myxosporea: Chloromyxidae) from the kidney of *Megophrys nasuta* Schlegel, 1858 (Anura: Pelobatidae) from Indonesia. *Acta Parasitologica*, 38: 83 – 86.
- MUTSCHMANN F. 2004: Pathological changes in African hyperoliid frogs due to a myxosporidian infection with a new species of *Hoferellus* (Myxozoa). *Diseases of Aquatic Organisms*, 60: 215 – 222.

- NO'BREGA R. H., BATLOUNI S. R., FRANC A. L. R. 2009: An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 197 – 206.
- 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.
- 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.
- REDA E. S. A. 2010: *Chloromyxum aegypticus* n. sp. (Myxozoa: Chloromyxidae) infecting the testicular tissue of Egyptian toad, *Bufo regularis* (Amphibia: Bufonidae), and its pathogenicity. *Parasitology Research*, 107: 1299 – 1306.
- SARKAR N. K. 1982: Myxosporidian *Myxidium haldari* sp. n. (Myxozoa: Myxidiidae) from Indian Tree frog *Hyla arborea*. *Acta Protozoologica*, 21: 197 – 199.
- 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 (Myxosporea: Bivalvulida) parasitic in the Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei: Serranidae) and the cell-mediated immune reaction: a light and electron microscopy study. *Parasitology Research*, 79: 119 – 129.
- 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.
- 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.
- UPTON S., FREED P. S., FREED D. A., MCALLISTER C. T., GOLDBERG S. R. 1992: Testicular Myxosporidiasis in the Flat-Backed Toad, *Bufo maculatus* (Amphibia: Bufonidae), from Cameroon, Africa. *Journal of Wildlife Diseases*, 28: 326 – 329.
- UPTON S., MCALLISTER C. T., TRAUTH S. E. 1995: A New Species of *Chloromyxum* (Myxozoa: Chloromyxidae) from the Gall Bladder of *Eurycea* spp. (Caudata: Plethodontidae) in North America. *Journal of Wildlife Diseases*, 31: 394 – 396.
- WEILL R. 1938. L'interprétation des Cnidosporidies et la valeur taxonomique de leur cnidome. Leur cycle comparé à la phase larvaire des Narcomeduses Culinides. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereaux*, 13: 727 – 744.

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

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.