

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Nové fylogenetické markery pro rekonstrukci
fylogeneze myxozoi**

Bakalářská práce

Jiří Kyslík

Vedoucí práce: RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

České Budějovice 2014

Kyslík, J., 2014: Nové fylogenetické markery pro rekonstrukci fylogeneze myxozoi. [New phylogenetic markers for phylogenetic reconstruction of Myxozoa. Bc. Thesis, in Czech.]– 43 p., Faculty of science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace:

Phylogenetic placement of the Myxozoa within the Cnidaria is still not clearly understood, although there are many supports of close relationships between Myxozoa and Medusozoa. This thesis addresses the issue of the phylogenetic position of Myxozoa based on mitochondrial genes (rns and NADH 1). Determination of the position and order of these genes in the mitochondrial genome together with results of phylogenetic analysis might be the key for deciphering of myxozoan phylogeny and declare the phylogenetic placement of the Myxozoa within the Cnidaria. Rns was found to be a new promising phylogenetic marker in the cnidarian phylogeny which may resolve the problem of myxozoan placement.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, archivované Přírodovědeckou fakultou 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

Datum:

Podpis:

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval svému vedoucímu práce Ivanu Fialovi, Ph.D. za jeho dohled na mém projektu a také za jeho prospěšné rady. Dále bych poděkoval pracovníkům Laboratoře rybí protistologie, kteří mi poskytli opravdu dobrý základ a příjemnou atmosféru. Také bych poděkoval kolegyním Tereze Tomkové, Janě Müllerové a nakonec velký dík patří mým rodičům, s jejichž pomocí jsem mohl studovat a byli mi vždy oporou během mého studia.

OBSAH

1. OBECNÝ ÚVOD	1
1.1 Základní charakteristika Myxozoi	1
1.2 Morfologie myxozoi	2
1.3 Životní cyklus Myxosporeí.....	4
1.4 Ekonomicky významní zástupci myxozoi.....	6
2. TAXONOMIE A FYLOGENEZE MYXOZOÍ	8
2.1 Systematické zařazení myxozoi	8
2.2 Taxonomie a fylogeneze v rámci myxozoi.....	9
2.2.1.1 Mitochondriální markery.....	12
3. CÍLE PRÁCE	14
4. MATERIÁL A METODY	15
4.1 Materiál.....	15
4.2 BLAST analýza	15
4.3 Příprava primerů	15
4.4 Amplifikace vybraných genů	15
4.5 Gelová elektroforéza a izolace produktů	16
4.6 Klonování PCR produktů a izolace plazmidové DNA	16
4.7 Sekvenování cílových genů	16
4.8 Fylogenetické analýzy	17
4.9 Predikce transmembránových helixů	17
5. VÝSLEDKY	18
5.1 Analýza genomických dat	18
5.2 Pořadí a identifikace genů	19
5.3 Fylogenetické analýzy	20
5.4 Predikce transmembránových helixů	28
6. DISKUZE	29
7. ZÁVĚR	31
8. ZDROJE	32
9. PŘÍLOHY	37

1. OBECNÝ ÚVOD

1.1 Základní charakteristika Myxozoi

Myxozoa jsou obligátní mnohobuněční parazité s velmi redukovanou velikostí těla. Tato tělesná redukce, která se patrně vyvinula z důvodu přechodu k parazitickému způsobu života je příkladem regresní evoluce, jež je charakteristická pro mnoho skupin parazitů (Poulin 2003). Myxozoa představují velkou diverzifikovanou skupinu zahrnující až 2200 druhů (Lom a Dyková 2006).

Pro tuto parazitickou skupinu je typický životní cyklus jehož součástí je bezobratlý i obratlovčí hostitel (Markiw a Wolf 1983; El-Matbouli a kol. 1992). Jejich běžnými obratlovčími hostitely jsou zejména ryby, nicméně přítomnost těchto parazitů byla zaznamenána i u obojživelníků, plazů, ptáků a savců (Théodoridès a kol. 1981; Eiras 2005; Bartholomew a kol. 2008; Prunescu a kol. 2007). Význam myxozoi spočívá především v napadání ekonomicky významných hostitelů – jako jsou právě ryby, u nichž některé druhy myxozoi mohou způsobovat masivní úhyny (viz. kapitola 1.4).

Co se týče fylogenetického a taxonomického postavení myxozoi v rámci metazoi prošla tato skupina mnohými změnami. Z hlediska taxonomie byly tyto organismy považovány nejprve za jednobuněčné parazity patřící do skupiny Protozoa, avšak posléze byly vyčleněny a zařazeny k metazoiím (Siddall a kol. 1995) (viz. podkapitola 2.1). Tradiční taxonomie v rámci myxozoi byla a stále z větší části je založena na morfologii spor těchto parazitů, avšak později se ukázalo, že toto členění je v rozporu se získanými molekulárními daty (Kent a kol. 2001). Vysvětlení tohoto problému spočívá ve velmi časté morfologické konvergenci určitých typů spor a také v tom, že morfologické vymezení některých rodů je nejasné (viz. podkapitola 2.2).

Z fylogenetického hlediska se skupina Myxozoa stala problematickým taxonem, který donedávna nebylo možné jednoznačně zařadit v rámci metazoi. Recetní studie ovšem poukazují na jistou inklinaci tohoto taxonu ke skupině žahavců (Cnidaria) (Jiménez-Guri a kol. 2007; Holland a kol. 2011; Nesnidal a kol. 2013).

1.2 Morfologie myxozoi

Zástupce myxozoi lze charakterizovat jako mikroskopické mnohobuněčné parazity, které svou morfologií připomínají protista, přesto ale mají některé apomorfie (diferenciace buněk, desmosomu podobné buněčné spoje), které jsou společné pro celou živočišnou říši (Smothers a kol. 1994). Některé znaky myxozoi však můžeme nalézt i u jiných skupin organismů mimo metazoa. Příkladem je parazitická skupina Microsporidia (Fungi, Opisthokonta), se kterou byla Myxozoa v minulosti řazena do jednoho taxonu (Cnidosporidia). Společným znakem myxozoi a mikrosporidií je přítomnost spory s vystřelovacím aparátem ve vývojovém cyklu. Typickým stádiem myxozoi je spora. Obecně se spory skládají z několika buněk, ze kterých se transformují chlopně spory, sporoplasma (vlastní améboidní infekční zárodek) a pólové váčky, obsahující stočená vymrštitelná vlákna. Morfologie pólových váček je totožná s cnidocyty žahavců (Siddall a kol. 1995). Tato morfologie spory je charakteristická pro myxosporeovou fázi vývoje parazita v obratlovčím hostiteli (tzv. myxospora, Obr. 1A). Naproti tomu v bezobratlém hostiteli je morfologie spory odlišná - vzniká tzv. aktinospora (viz. Obr. 1B), která má často triradiální symetrii, např. u typu triactinomyxon připomíná kotvu s vyčnívajícími výběžky v místě ústí tří pólových váček. Sporoplasma aktinospor obsahuje velké množství infekčních buněk (Lom a Dyková 1992).

Plasmodia představují vegetativní stádia myxosporeí, které mohou dosahovat až makroskopických rozměrů. Podle lokalizace rozlišujeme plasmodia histozoická (ve tkáních) a coleozoická (v dutinových orgánech). Histozoická plasmodia mívají často podobu makroskopických cyst, které jsou v pozdější fázi vývoje vyplněny sporami. Typickým znakem ve vývoji myxozoi je vytváření tzv. buněk v buňce (cell-in-cell). Plasmodia obsahují vegetativní jádra a generativní buňky, ze kterých diferenciací vznikají jednotlivé buňky tvořící sporu.

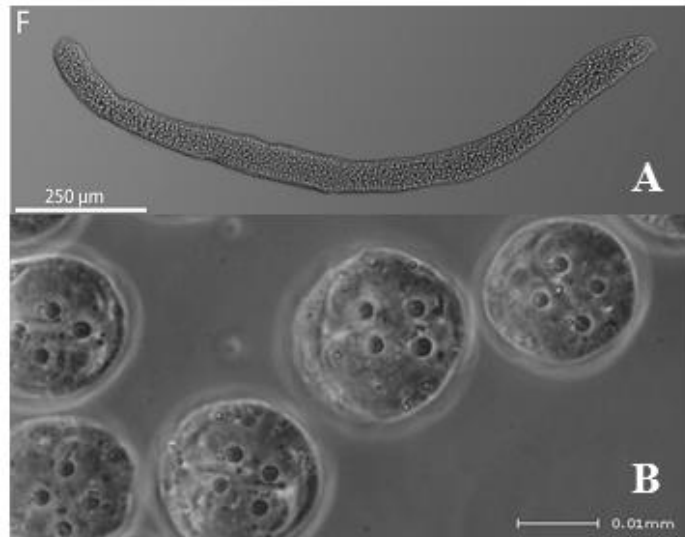
Mezi znaky malacosporeí, primitivních zástupců myxozoi parazitujících u sladkovodních mechovek (Bryozoa), patří zachování rozsáhlých vrstev buněk s junkčními



Obrázek 1: Různé typy spor Myxozoi. /A/ Myxospora *Chloromyxum cristatum* (SEM) (převzato od Miloslav Jirků); /B/ Aktinospora (triactinomyxon forma) *Myxobolus cerebralis* (převzato od Stephena Atkinsona, FishPathogens.net)

komplexy. Nejznámějšími zástupci jsou *Buddenbrockia plumatellae* a *Tetracapsuloides bryosalmonae*, přičemž *B. plumatellae* je charakteristická červovitým typem těla (Obr. 2A) naproti tomu *T. bryosalmonae* tvoří v mechovkách vakovité útvary. Obě stádia produkují spory ve své vnitřní dutině charakteristické čtyřmi pólovými váčky (Obr. 2B). Spory malacosporeí se od myxosporeí liší v absenci diferenciaci během životního cyklu (Hartikainen a kol. 2014).

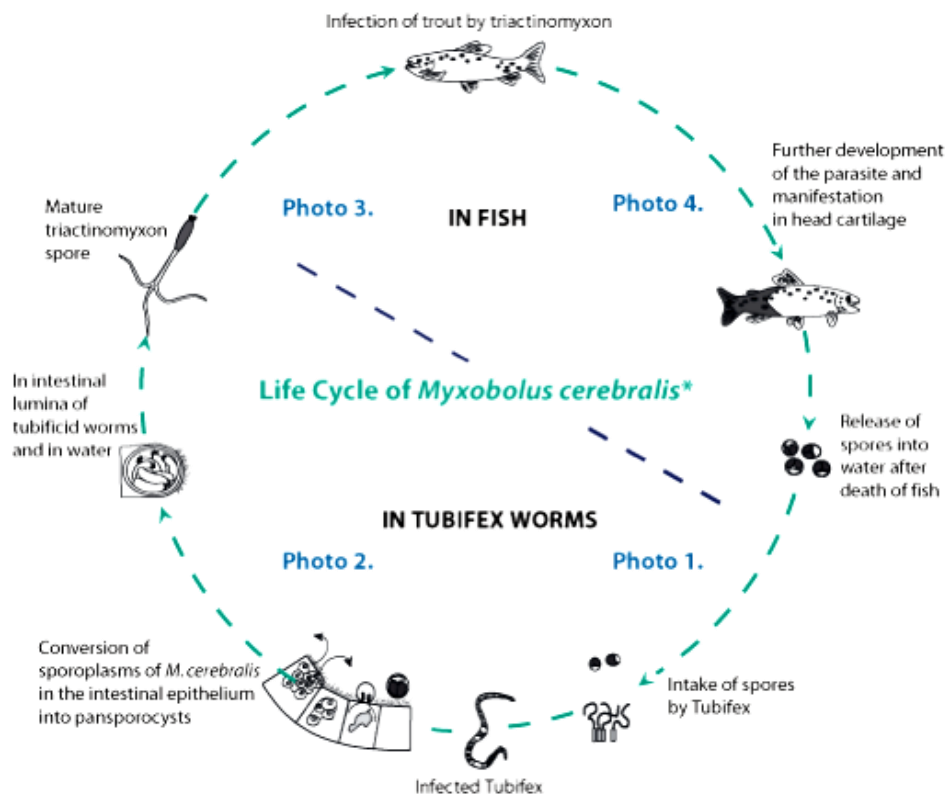
Z ultrastrukturálního pohledu mají buňky myxozoi v cytoplasmě volně rozmístěné ribozomy, mitochondrie s kristami tubulárního, diskovitého nebo plochého typu. Zásobními látkami mohou být například tuk nebo glykogen. Od běžné buněčné typizace eukaryot se Myxozoa liší v absenci bičíků a centriol, jejichž nepřítomnost lze odvodit ze sekundární ztráty během evoluce (Lom a Dyková 2006).



Obrázek 2: Zástupci malacosporeí. /A/ červovité tělo *Buddenbrockia plumatellae*, /B/ malacospora *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Hartikainen a kol., 2014; Tops S., Natural History Museum, London).

1.3 Životní cyklus Myxosporeí

Z hlediska životního cyklu byla Myxozoa po dlouhou dobu považována za monoxenní skupinu parazitů ryb. Velký převrat nastal v polovině osmdesátých let minulého století (Markiw a Wolf 1984), kdy bylo zjištěno, že vývoj myxospory v obratlovčím hostiteli tvoří pouze polovinu životního cyklu myxosporeí, přičemž vývoj pokračuje ve vodních kroužkvcích jako aktinosporeová fáze. Myxosporea se tedy začala považovat za skupinu dixenních parazitů a taxonomická skupina Actinosporea byla zrušena. Prvním druhem, u kterého byl kompletní životní cyklus popsán, je *Myxobolus cerebralis* (viz. Obr. 3). Celý cyklus se skládá ze dvou fází (myxosporeové a aktinosporeové), které probíhají mezi dvěma různými hostiteli a na jehož konci vznikají odlišné typy spor (Lom 1996). Myxosporeová fáze životního cyklu modelového organismu *M. cerebralis* je započata kontaktem aktinospory uvolněné z bezobratlého hostitele s pokožkou obratlovčího hostitele. Proces uvnitř hostitele je doprovázen uvolněním sporoplasmy, která se poté dělí a vytváří typické útvary tzv. „buňka v buňce“. To znamená, že se sekundární buňky vzniklé endogenním způsobem nachází uvnitř primární buňky. Takto vzniklá mnohobuněčná stádia poté migrují intercelulárně do tkání, kde pokračuje jejich dělení.



Obrázek 3: Životní cyklus *Myxobolus cerebralis* (převzato ze Science 473).

Samotný vývoj spor probíhá během sporogonické fáze, kdy primární a sekundární linie buněk z předchozí presporogonické fáze proliferují a diferencují za vzniku myxospory, která se poté uvolňuje ze svého hostitele a pokračuje do další aktinosporeové části životního cyklu.

Následnou částí životního cyklu myxozoi je vývoj aktinospor uvnitř bezobratlého hostitele, který lze rozdělit na tři fáze. První fáze – schizogonie – představuje přichycení spory k epitelu hostitele a následné mnohonásobné dělení sporoplasmy za vzniku vícejaderných stádií. Druhá fáze – gametogonie – zahrnuje mitotické a meiotické dělení somatických a generativních buněk za vzniku zygot obalených somatickými buňkami. A nakonec třetí fáze – sporogonie, což je tvorba samotné spory, jež je doprovázena mitotickým dělením a periferní diferenciací buněk. Z aktinosporeové části cyklu se uvolňuje aktinospora napadající opět obratlovčího hostitele a celý cyklus se opakuje.

1.4 Ekonomicky významní zástupci myxozoi

Ekonomický význam myxozoi spočívá zejména v jejich patogenním efektu na rybí hostitele. Nicméně přímý patogenní účinek mají pouze někteří zástupci myxozoi a to zejména u komerčně chovaných ryb. Mezi nejvýznamnější zástupce způsobující ekonomické škody zejména v souvislosti s masivními úhyny ryb lze zařadit následující druhy: *Myxobolus cerebralis*, *Enteromyxum leei*, *Kudoa thyrsites*, *Ceratomyxa shasta*, *Tetracapsuloides bryosalmonae* (viz. Tab. 1).

K dobře známým patogenním účinkům *Enteromyxum leei* patří tvorba střevních katarů u ryb ze Středozemního moře (Diamant a kol., 1994; Rigos a Katharios, 2010). *Myxobolus cerebralis* působí tzv. „whirling disease“ u mladých lososovitých ryb s vysokou mírou úmrtnosti. Infekce je doprovázena strukturálními a behaviorálními abnormalitami jako jsou deformace těla, zkrácení čelistí, plavání v kruzích apod. (Bartholomew a kol. 2002).

Kudoa thyrsites, převládající ve farmách chovající lososy, způsobuje posmrtnou lyzi masa. Toto znehodnocení kvality ryb se následně odráží v ekonomickém poklesu z hlediska exportu takto nakažených ryb (Kent a Poppe, 1998).

Tabulka 1: Seznam vybraných zástupců podle druhu výzkumu (živ. cyklus převzat z Lom a Dyková 2006)

DRUH VÝZKUMU	MODELOVÝ PARAZIT	ODKAZY
Životní cyklus	<i>Sphaerospora renicola</i>	Shulman, 1966
	<i>Sphaeromyxa sabrazesi</i>	Grassé a Lavette, 1978
	<i>Hemeguya adiposa</i>	Current, 1979
	<i>Myxobolus cerebralis</i>	Wolf a Markiw, 1983
	<i>Sphaerospora molnari</i>	Lom, 1990
	<i>Myxidium bergense</i>	Siddal a kol., 1995
	<i>Ceratomyxa shasta</i>	Bartholomew a kol., 1997
	<i>Myxobolus ampullicapsulatus</i>	Kent a kol., 2001
	<i>Myxosoma cerebralis</i>	Markiw a Wolf, 2007
	Patogenní efekt	<i>Ceratomyxa shasta</i>
<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>		Hedric a kol., 1993
<i>Myxobolus cerebralis</i>		Hedric a kol., 1998
<i>Enteromyxum leei</i>		Rigos a Katharios, 2010
<i>Kudoa thyrsites</i>		Matsukane a kol., 2010

Dalším příkladem parazita lososovitých ryb je *Ceratomyxa shasta* parazitující v pobřežních oblastech Severní Ameriky v Tichém oceánu. Tento zástupce je zároveň mezi myxozoi nejvíce patogenní. Mezi příznaky napadení patří letargie, ztráta tělesné hmotnosti, ztmavnutí kůže, ledvinové puchýřky aj. Tyto příznaky se liší u jednotlivých druhů lososů a zároveň závisí na životní fázi hostitele. *C. shasta* napadá zejména trávicí trakt, játra, žlučník, slezinu, pohlavní žlázy a ledviny (Bartholomew a kol., 1989).

Patogenním zástupcem z třídy Malacosporea je *Tetracapsuloides bryosalmonae*, který působí proliferativní onemocnění ledvin u lososů chovaných v Evropě a Severní Americe. Mezi symptomy lze zahrnout bledost a značné zvětšení ledvin (Sterud a kol., 2007; Wahli a kol., 2007).

2. TAXONOMIE A FYLOGENEZE MYXOZOÍ

2.1 Systematické zařazení myxozoí

Taxonomické začlenění myxozoí prodělalo během historie poznání této skupiny mnoho významných změn. Zpočátku přiřazovala tradiční taxonomie Myxozoa do skupiny s názvem Sporozoa (třída v rámci Protozoa) (Bütschli 1882), kam byly řazeny významné skupiny prvoků jako jsou kokcidie, malarická plasmodia nebo hemogregariny. V druhé polovině dvacátého století byla skupina Myxosporidia zařazena spolu se skupinou Microsporidia do třídy prvoků s názvem Cnidosporidia (Grell 1973). Později s příchodem 5 doménového systému eukaryotní říše (Whittaker 1969) byla Cnidosporidia pozvednuta na úroveň kmene (Margulis a Schwartz 1988). Přes toto systematické řazení byla Myxozoa spojována také s živočichy a to na základě podobnosti pólových váčků a cnidocytů u žahavců a také díky přítomnosti typických živočišných buněčných spojů (Štolc, 1899; Weill, 1938). S nástupem fylogenetických analýz molekulárních dat na počátku devadesátých let 20. století byla Myxozoa definitivně přeřazena k metazoím (Smothers a kol., 1994).

Nicméně molekulární SSU rDNA data jsou nedostačující k rozhodnutí, zda Myxozoa jsou úzce spojeny se skupinou Bilateria nebo Cnidaria (včetně *Polypodium hydriforme*), popřípadě s jinými taxony (Hanelt a kol., 1996; Smothers a kol., 1994; Siddall a kol., 1995; Siddall a Whiting, 1999). Tento problém byl podroben řadě analýz (např. Zrzavý a Hypša 2003; Jiménez-Guri a kol. 2007, Nesnidal a kol. 2013). Z výsledků studií vyplývá, že v případě, že analýza je založena na tzv. ribozomálních datech (rDNA), Myxozoa jsou přitahována k bilateriím a pokud na protein kódujících datech - ke cnidáriím (viz Obr. 4).

Znovuobjevení *Buddenbrockia plumatellae*, parazita červovitého typu, jako druhu myxozoí bylo podstatným klíčem k objasnění původu myxozoí. SSU rDNA tohoto záhadného červa ukázala, že *B. plumatellae* by měla být přiřazena do třídy Malacosporea, sesterská skupina k Myxosporea (Myxozoa). V důsledku toho byla Myxozoa nejdříve považována za Bilateria na základě červovité morfologie (Monteiro a kol. 2002). Nicméně, fylogenetická analýza přibližně 60 genů kódujících proteiny (Jimenez-Guri a kol. 2007) vyloučila bilatérní původ *B. plumatellae* a podpořila umístění myxozoí jako sesterské skupiny cnidarií. Příbuznost myxozoí k žahavcům byla nedávno potvrzena průkazem přítomnosti genu pro minicolagen v genomu myxozoí (Holland a kol. 2011). Tento gen je specifický pouze pro žahavce.

2.2 Taxonomie a fylogeneze v rámci myxozoi

Přetrvávající klasifikace v rámci myxozoi je založena zejména na morfologii spor, nicméně neodráží fylogenetické vztahy (Lom a Noble 1984, Fiala a kol. 2014). Přibližně 2200 popsaných druhů je řazeno do 60 rodů (Lom a Dyková 2006). Přehledné taxonomické schéma je shrnuto v tabulce 2. Nejvíce zástupců najdeme u rodu *Myxobolus* (přibližně 800 popsaných druhů (Liu a kol. 2013), který je typickým představitelem myxozoi.

Nesoulad mezi výsledky fylogenetických analýz a taxonomií založené na morfologii je dán částečně tím, že některé rody mají nejisté hranice, které je definují, např. *Myxidium* a *Zschokkela* nebo *Ceratomyxa* a *Leptotheca* (Lom a Dyková, 2006). Hlavní příčina je ovšem v tom, že Myxozoa jsou příbuzná na základě jiných faktorů než morfologie spory. Mezi tyto faktory patří zejména prostředí hostitele (mořské x sladkovodní) a lokalizace v hostiteli (coelozoická x histozoická) (Fiala 2006). Myxozoa tvoří základní fylogenetické linie korelující s mořským, respektive sladkovodním prostředím. V rámci těchto linií jsou podskupiny myxosporeí, které spolu klastrují na základě parazitace ve žlučovém měchýři, močovém měchýři a v histozoických tkáních. Proto je většina současných rodů myxosporeí poly- nebo parafyletická. Ukázalo se, že během evoluce mohly vznikat stejné morfotypy spor několikrát na sobě nezávisle (Fiala a Bartošová 2010).

Tabulka 2: Současná nomenklatura skupiny Myxozoa (Fiala a kol. 2014).

Kmen **Cnidaria**

Nezařazený podkmen **Myxozoa**

Třída **Malacosporea**

Řád **Malacovalvulida**

Rodina **Saccosporidae**: *Buddenbrockia*, *Tetracapsuloides*

Třída **Myxosporea**

Řád **Bivalvulida**

Podřád **Variisporina**

Rodina **Sphaeromyxidae**: *Sphaeromyxa*

Rodina **Myxidiidae**: *Myxidium*, *Zschokkella*, *Enteromyxum*, *Soricimyxum*,
Cystodiscus

Rodina **Ortholineidae**: *Ortholinea*, *Neomyxobolus*, *Cardimyxobolus*, *Triangula*,
Kentmoseria

Rodina **Sinuolineidae**: *Sinuolinea*, *Myxodavisia*, *Myxoproteus*, *Bipteria*,
Paramyxoproteus,

Neobipteria, *Schulmania*, *Noblea*, *Latyspora*

Rodina **Fabesporidae**: *Fabespora*

Rodina **Ceratomyxidae**: *Ceratomyxa*, *Meglitschia*, *Ellipsomyxa*, *Ceratonova*

Rodina **Sphaerosporidae**: *Sphaerospora*, *Wardia*, *Palliatius*

Rodina **Myxobilatidae**: *Myxobilatus*, *Acauda*, *Hoferellus* (*nomen conservandum*)

Rodina **Chloromyxidae**: *Chloromyxum*, *Caudomyxum*, *Agarella*

Rodina **Coccomyxidae**: *Coccomyxa*, *Auerbachia*, *Globospora*

Rodina **Alatosporidae**: *Alatospora*, *Pseudoalatospora*, *Renispora*

Rodina **Parvicapsulidae**: *Parvicapsula*, *Neoparvicapsula*, *Gadimyxa*

Podřád **Platysporina**

Rodina **Myxobolidae**: *Myxobolus*, *Spirosuturia*, *Unicauda*, *Dicauda*, *Phlogospora*
Laterocaudata, *Henneguya*, *Hennegoides*, *Tetrauronema*, *Thelohanellus*,
Neothelohanellus,

Neohenneguya, *Trigonosporus*

Nejasné zařazení u Bivalvulida: *Sigmomyxa*

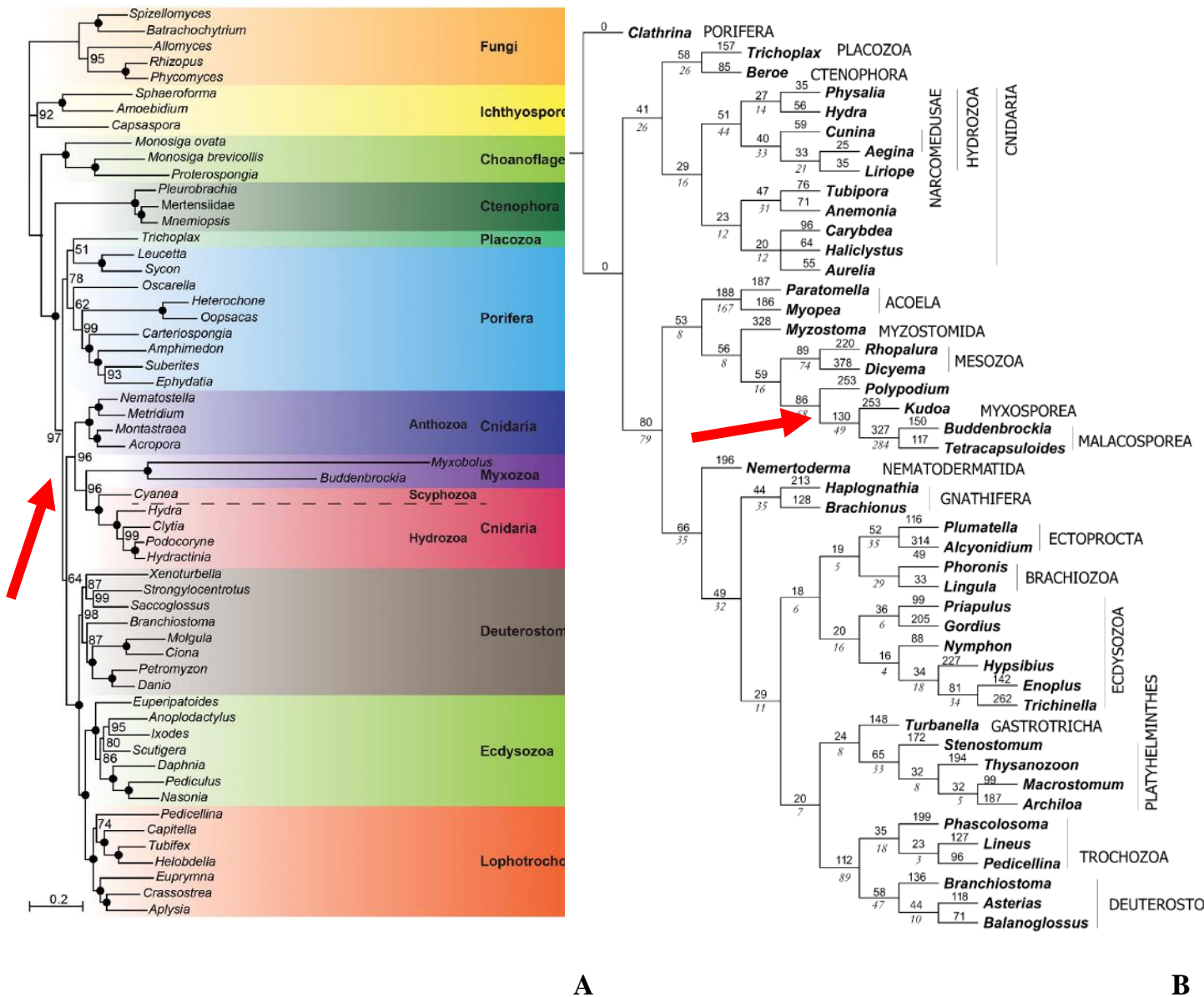
Řád **Multivalvulida**

Rodina **Trilosporidae**: *Trilospora*, *Unicapsula*

Rodina **Kudoidae**: *Kudoa*

Rodina **Spinavaculidae**: *Octospina*

Nejasné zařazení u Multivalvulida: *Trilosporoides*



Obrázek 4: Pohled na fylogenetické postavení Myxozoi v rámci Metazoi. /A/ Fylogeneze založená na genomových datech; /B/ Fylogeneze založená na ribozomálních datech (převzato z Nesnidal a kol., 2013; Zrzavý a Hypša, 2003).

2.2.1 Fylogenetické molekulární markery

Molekulární fylogeneze využívá širokou škálu molekulárních markerů jako klíč k rozluštění fylogenetických vztahů mezi organismy. Tyto markery představují geny vyznačující se určitou perzistencí v evoluci. Nedílnou součástí použití vhodného markeru pro fylogenezi je důležitá nutnost určité evolučně–konzervativní části. Nejčastěji využívaným fylogenetickým markerem je gen pro RNA malé ribosomální podjednotky (SSU rDNA). Obsahuje konzervativní úseky i úseky, které jsou velmi variabilní mezi jednotlivými organismy a proto je vhodný pro širokou škálu fylogenetických analýz. Nicméně má také své limity (chybějící fylogenetická informace pro rozlišení některých nodů) a je náchylný k tzv. long branch attraction – artefaktu přitahování dlouhých větví ve fylogenetickém stromu (např. Anderson a Swofford 2004). Proto je nezbytné pátrat po nových vhodných fylogenetických markerech pro danou skupinu organismů a pro danou úroveň fylogeneze.

U myxozoi byl úspěšně použit kromě SSU rDNA i druhý rDNA gen – gen pro RNA velké ribosomální podjednotky (LSU rDNA) (Bartošová a kol. 2009). Zjistilo se, že LSU rDNA je více informativní než SSU rDNA a byla doporučena pro řešení fylogeneze myxozoi jeho kombinace s SSU rDNA markerem. Nicméně SSU i LSU rDNA mají společnou evoluci a pro potvrzení evolučních vztahů myxozoi, které zásadně nesouhlasily s taxonomií, bylo nutné získat jiný gen nezávislý na evoluci rDNA. Tím byl elongační faktor 2 (EF2), jehož fylogenetická analýza potvrdila fylogenezi založenou na rDNA datech (Fiala a Bartošová 2010).

2.2.1.1 Mitochondriální markery

Využití mitochondriálních genů jako molekulárních markerů pro fylogenezi a systematiku významně ovlivnilo pohled na posuzování vztahů mezi organismy (Gartier a kol. 2009). Maternální a klonální dědičnost mt genomu obsahuje určité výhody oproti jadernému genomu z důvodu nepřítomnosti rekombinačních procesů, jakož i jeho menší velikosti (Birky 2001). Nicméně absence rekombinačních mechanismů byly nedávno vyvráceny (Barr a kol. 2005; White a kol. 2008). Z fylogenetického hlediska je mt genom evolučně stabilní (Marechal-Drouard 2012). Výhodnost využití tohoto genomu pro fylogenetické analýzy tkví v nezávislosti na vývoji jaderné DNA, což představuje možnost porovnání fylogeneze konstruované na základě jaderných markerů a nejaderných markerů.

Prvním a zatím jediným fylogenetickým markerem použitým u myxozoi byl gen pro 16S rDNA (Cinková, 2010). Výsledky fylogenetických analýz 16S rDNA se shodovaly s

analýzami multigenových dat (Jiménez-Guri a kol., 2007). Nicméně, charakter genu a pravděpodobný artefakt přitahování dlouhých větví naznačují možné chybné interpretace příbuzenských vztahů a znehodnocují vhodnost tohoto genu pro zjištění fylogenetické pozice myxozoi v rámci metazoi.

3. CÍLE PRÁCE

Pokusit se vyhledat molekulární markery, které budou schopny poskytnout dostatečnou fylogenetickou informaci pro:

- 1) zjištění přesnějšího postavení myxozoi uvnitř žahavců
- 2) rozlišení nestabilních/slabě podpořených uzlů fylogenetického stromu myxozoi

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

Pro tuto bakalářskou práci byly použity vzorky parazitů z širokého spektra rodů myxozoí. Vzorky byly poskytnuty Laboratoří rybí protistologie. Seznam jednotlivých vzorků včetně jejich identifikačních čísel a lokalit sběru je uveden v Tab.6 (viz. kapitola 8. Přílohy).

4.2 BLAST analýza

Pro vyhledání homologních úseků mitochondriálních genů v částečném genomu *Myxobolus cerebralis* (Nesnidal a kol. 2013) byl použit program BLAST+ (verze ncbi-blast-2.2.29+). Byly vytvořeny tři sety sekvencí mitochondriálních genů tří zástupců žahavců ze skupin Anthozoa, Scyphozoa a Hydrozoa. Tyto tzv. „queries“ byly porovnávány s databází vytvořenou z genomických dat *M. cerebralis* pomocí algoritmů blastn a tblastx. Databáze *M. cerebralis* byla vytvořena z dat publikovaných v archivu „hrubých“ sekvenčních dat (Sequence Read Archive, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/>) pod přístupovým kódem SRA062243.

4.3 Příprava primerů

Na základě zjištěných homologií dvou mitochondriálních genů s genomickými sekvencemi *Myxobolus cerebralis* byly zkonstruovány dva alignmenty v programu SeaView, které obsahovaly sekvence *M. cerebralis*, zástupce žahavců a ryb. Alignment sloužil pro vyhledání vhodných úseků k vytvoření primerů tak, aby sekvence byly co možná nejvíce homologní s žahavci (zejména s *M. cerebralis*) a dostatečně se lišily od ryb. Navrhnuté sekvence primerů byly testovány programem OligoAnalyzer 3.1, zda-li netvoří primer-dimery a hairpin struktury. Primery podle vybraných sekvencí byly syntetizovány firmou Generi-Biotech s.r.o. (Hradec Králové, ČR). Seznam navržených primerů je uveden v Tab. 5.

4.4 Amplifikace vybraných genů

Amplifikace vybraných DNA markerů byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Jako templát byla použita DNA ze vzorků uvedených v Tab. 4, ve které jsou také uvedeny PCR podmínky a způsob cyklování. U každé amplifikace byla použita negativní kontrola.

Pro dosažení žádaného PCR produktu bylo využito několika modifikací během PCR metody. Bylo testováno několik různých teplot pro nasedání primerů, pokoušeli jsme se amplifikovat jednotlivé geny s využitím standartní RedTaq polymerázy, ale i Titanium PCR. Dalšími způsoby modifikací PCR metody bylo využití následné PCR s použitím vnitřních primerů - nested PCR. Pomocí step-out PCR jsme se pokusili naamplifikovat sekvence vedoucí opačným směrem od těchto genů (Burger a kol. 2007).

4.5 Gelová elektroforéza a izolace produktů

Ke zjištění správné velikosti amplifikovaných PCR produktů byla použita gelová elektroforéza. Elektroforéza se prováděla na 1% (v/w) agarózovém gelu za použití 0,5 % TAE pufru. Správná velikost daných produktů byla odhadnuta pomocí žebříčku (DNA ladder) o příslušné velikosti (100 bp/ 1000 bp). PCR produkty byly zviditelněny pomocí přístroje s UV spektrem. Následně byly takto ověřené produkty izolovány pomocí soupravy Gel/PCR fragment DNA Extraction Kit (Geneaid). Oproti protokolu byla na konci procesu namísto elučního pufru použita destilovaná PCR voda.

4.6 Klonování PCR produktů a izolace plazmidové DNA

PCR produkty o velmi nízké koncentraci byly klonovány do plazmidu, za účelem dosažení lepší kvality sekvencí pro konečné fylogenetické analýzy. Pro klonování byly použity kompetentní buňky (DH5alfa). Plazmidy obsahující naši cílovou sekvenci genu, byly izolovány pomocí soupravy High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

4.7 Sekvenování cílových genů

Jednotlivé fragmenty DNA byly sekvenovány, za použití Sangerovy metody a to u společnosti SeqMe s.r.o. Sekvenační reakce zahrnovaly 1 μ l (10 pmol) příslušného primeru pro sekvenování a 9 μ l izolovaného produktu PCR. Tento režim byl použit v případě dobré kvality produktu PCR izolovaného přímo z agarózového gelu. Pokud se jednalo o plazmidovou DNA, poměr byl vypočten na základě koncentrace produktu. Sekvenování produktů byla vždy prováděna v obou směrech.

4.8 Fylogenetické analýzy

Pro konstrukci fylogenetických stromů byly sestaveny datasety, které se skládaly ze získaných sekvencí a ze sekvencí vyhledaných v genové bance. Alignments byly vytvořeny v programu MAFFT v6.626b (Katoh a kol. 2002) pomocí L-INS-i metody. Program SEAVIEW 3.2 (Galtier a kol. 1996) sloužil k prohlížení alignmentů a k jejich úpravám, které spočívaly v odstranění zjevně nehomologických úseků ve velmi variabilních úsecích.

Fylogenetické stromy byly konstruovány třemi metodami – maximum likelihood (maximální pravděpodobnost, ML), maximum parsimony (maximální úspornost, MP) a Bayesovskou metodou (BI). ML stromy byly sestaveny v programu RAxML (Stamatakis 2006) s GTRGAMMA modelem. MP analýza byla provedena v programu PAUP* (Swofford 2002) s heuristickým způsobem vyhledávání, náhodným přikládáním taxonů a poměrem Ts:Tv = 1:2. Bootstrapová metoda byla založena na analýze 500 generovaných datasetů. BI byla provedena v programu Phylobayes ve dvou paralelních řetězcích s minimálním počtem 500 cyklů. Burnin byl nastaven na jednu pětinu celkového počtu cyklů.

Stromy byly vizualizovány v programu FigTree (Rambaut 2009) a graficky upraveny v programu Illustrator CCZ6.

4.9 Predikce transmembránových helixů

Analýza predikce transmembránových helixů byla provedena pomocí programu TMHMM Server v. 2.0 (Moller a kol. 2001) dostupném on-line na adrese: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

5. VÝSLEDKY

5.1 Analýza genomických dat

BLAST analýza částečného genomu *Myxobolus cerebralis* nalezla pouze několik homologních úseků k mitochondriálním genům tří vybraných zástupců skupiny Cnidaria. Největší homologie byla odhalena u cytochromu b a NADH1 genu. Další nalezené shody se vyznačovaly nízkým E-value. Nalezené homologie jsou shrnuty v Tab. 3.

Tabulka 3: Porovnání mitochondriálních genů zástupců kmene Cnidaria s genomovými daty *Myxobolus cerebralis* pomocí BLAST Standalone programu (sekvence převzaty z genové databáze NCBI).

Organismus/gen	zkratka genu	blastn	% shody	E-value	tblastx	% shody	E-value
<i>Alatina moseri</i>							
ATP syntáza 6	ATP6	x	x	x	x	x	x
ATP syntáza 8	ATP8	x	x	x	x	x	x
Cytochrom oxidáza 1	COX1	x	x	x	x	x	x
Cytochrom oxidáza 2	COX2	x	x	x	x	x	x
Cytochrom oxidáza 3	COX3	x	x	x	x	x	x
Cytochrom b	COB	x	x	x	22348_len_374	53.8	4.00E-08
Ribozomální RNA (malá podjednotka)	rns	x	x	x	x	x	x
Ribozomální RNA (velká podjednotka)	rnl	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 1	NADH1	x	x	x	4671_len_1379	37.3	0.003
NADH dehydrogenáza 2	NADH2	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 3	NADH3	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 4L	NADH4L	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 4L	NADH4L	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 5	NADH5	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 6	NADH6	x	x	x	16839_len_643	29.9	0.27
open reading frame 314	ORF314	x	x	x	x	x	x
Polymerase beta	POLB	x	x	x	x	x	x
<i>Hydra oligactis</i>							
ATP syntáza 6	ATP6	x	x	x	x	x	x
ATP syntáza 8	ATP8	x	x	x	14969_len_208	29.5	0.097
Cytochrom b	CYTB	x	x	x	22348_len_374	48.7	1.00E-06
Cytochrom c oxidáza 1	COX1C	x	x	x	x	x	x
Cytochrom oxidáza 1	COX1	x	x	x	x	x	x
Cytochrom oxidáza 2	COX2	x	x	x	4619_len_272	32.2	0.081
Cytochrom oxidáza 3	COX3	x	x	x	x	x	x
Ribozomální RNA (malá podjednotka)	rns	x	x	x	x	x	x
Ribozomální RNA (velká podjednotka)	rnl	x	x	x	11727_len_1245	34.1	0.046
NADH dehydrogenáza 1	NADH1	x	x	x	4671_len_1379	44.6	2.00E-05
NADH dehydrogenáza 2	NADH2	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 3	NADH3	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 4L	NADH4L	x	x	x	17852_len_244	30.4	0.093
NADH dehydrogenáza 4L	NADH4	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 5	NADH5	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 6	NADH6	x	x	x	x	x	x
<i>Nematostella sp.</i>							
ATP syntáza 6	ATP6	x	x	x	132_len_358	33.6	0.029
ATP syntáza 8	ATP8	x	x	x	x	x	x
Cytochrom b	CYTB	x	x	x	22348_len_374	56.1	9.00E-09
Cytochrom oxidáza 1	COX1	x	x	x	x	x	x
Cytochrom oxidáza 2	COX2	x	x	x	3765_len_252	31.3	0.15
Cytochrom oxidáza 3	COX3	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 1	NADH1	x	x	x	4671_len_1379	33.6	0.041
NADH dehydrogenáza 2	NADH2	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 3	NADH3	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 4L	NADH4	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 4L	NADH4L	x	x	x	x	x	x
NADH dehydrogenáza 5	NADH5	x	x	x	4671_len_1379	33.6	0.15
NADH dehydrogenáza 6	NADH6	x	x	x	x	x	x
Ribozomální RNA (malá podjednotka)	rns	x	x	x	x	x	x
Ribozomální RNA (velká podjednotka)	rnl	x	x	x	x	x	x

5.3 Fylogenetické analýzy

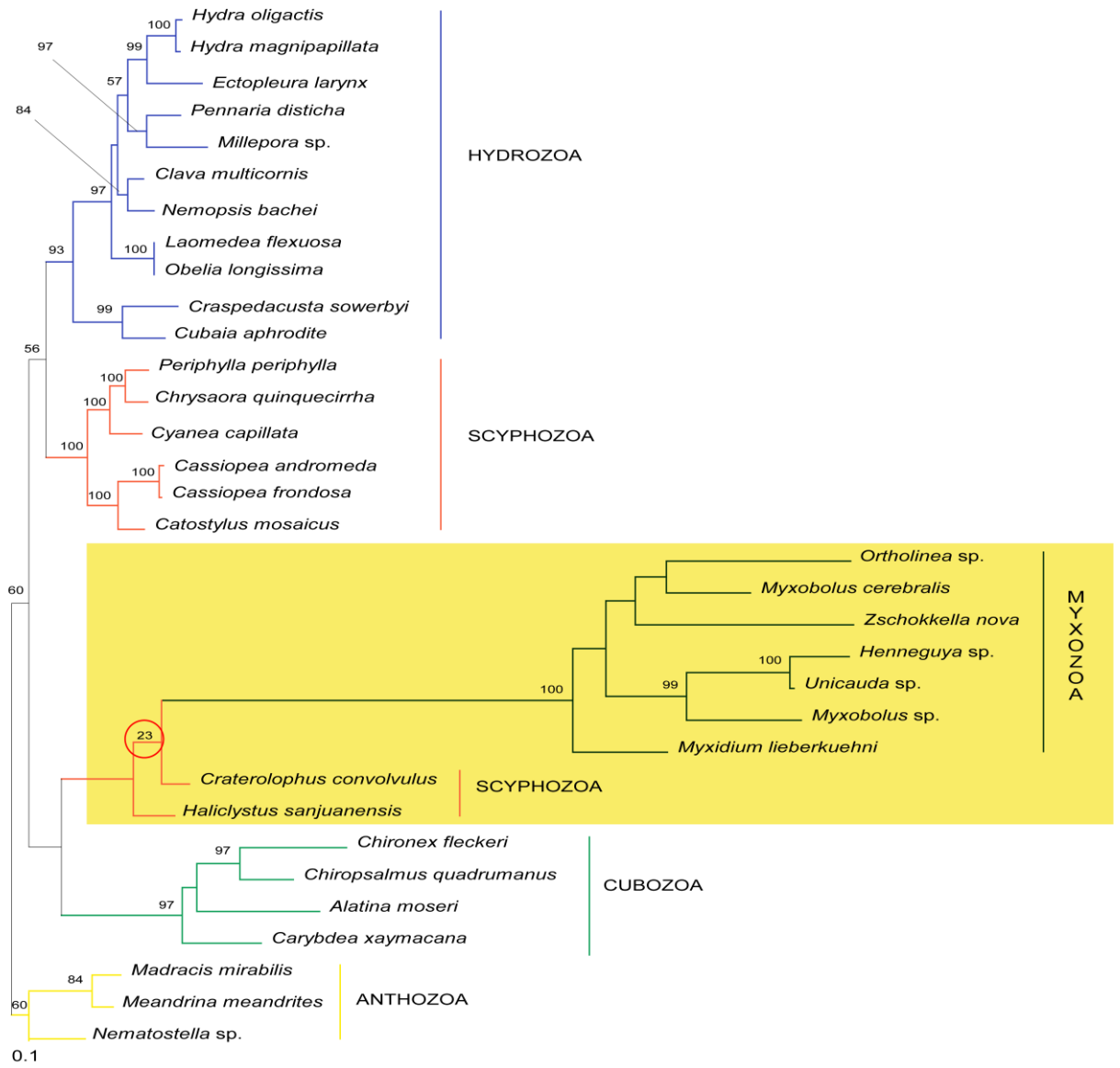
5.3.1 Analýza rns

Na základě navržených primerů pro amplifikaci rns genu myxozoi se podařilo amplifikovat šest druhů myxozoi z celkového počtu 51 testovaných vzorků. Použité analýzy (Maximum likelihood, Maximum Parsimony, Phylo-Bayes) vždy určily Myxozoa jako monofyletickou skupinu s relativně vysokými bootstrapovými hodnotami. Příbuzenské vztahy sedmi druhů myxosporeí jsou charakterizovány nízkou bootstrapovou podporou a nestabilitou při porovnání použitých metod (Obr. 6,7,8). Obdobně je i nestabilní pozice myxozoi v rámci žahavců (viz. Obr. 6,7,8).

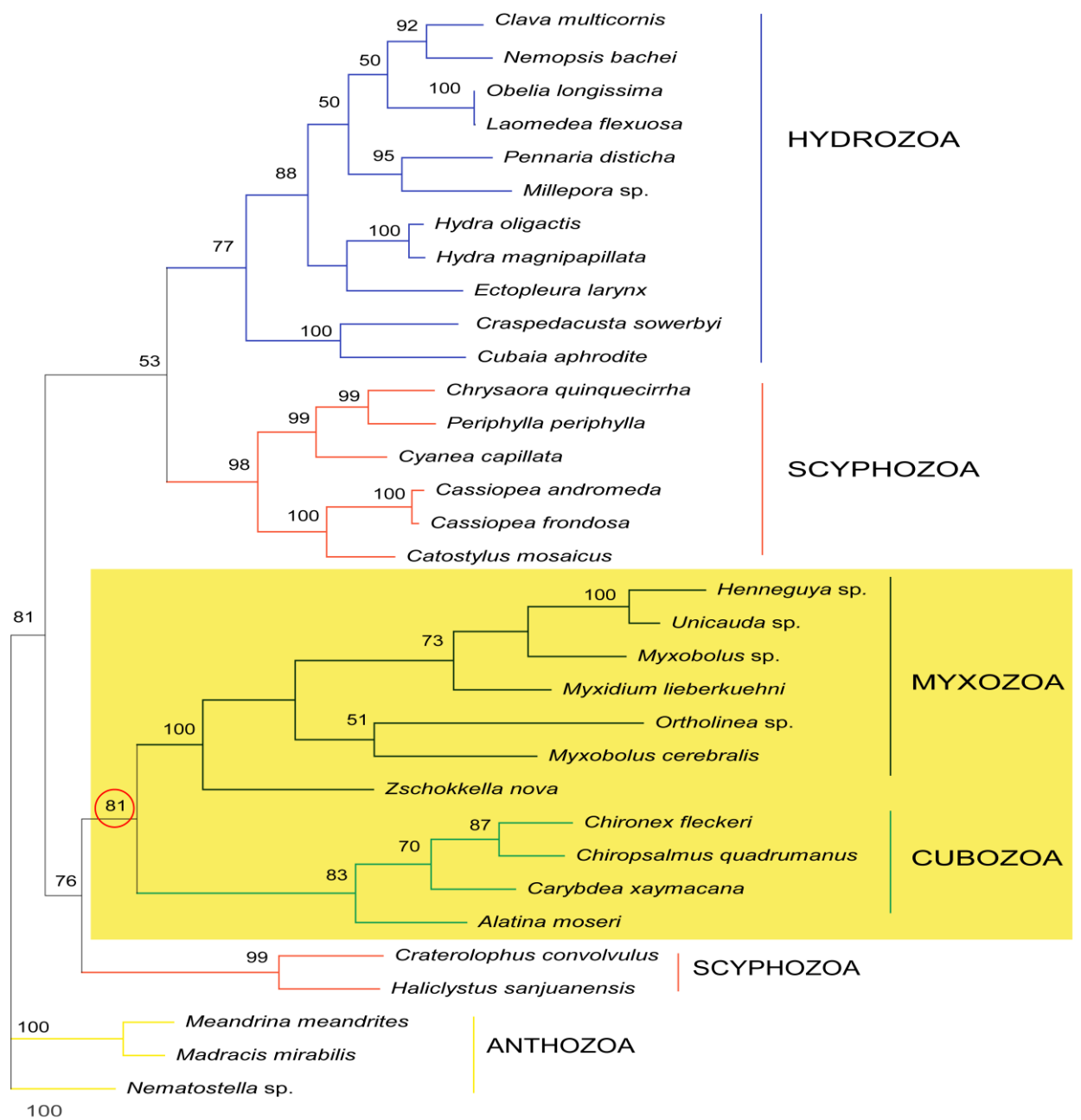
Maximum likelihood analýza (viz. Obr. 6.) naznačila, že skupina Myxozoa tvoří sesterský taxon se skupinou Scyphozoa. Nicméně bootstrapová podpora této pozice je velmi nízká (23%). V rámci myxozoi analýza určila druh *Myxidium lieberkuehni* jako bazální taxon studovaných myxosporeí. Druhy *Henneguya* sp. a *Unicauda* sp. jsou sesterské taxony k *Myxobolus* sp. Tyto vztahy jsou charakterizovány vysokou podporou bootstrapu. Naopak podpora nižší než 50% byla zaznamenána u sesterského kladu vůči výše zmíněným zástupcům, tj. vztahy mezi druhy *Ortholinea* sp., *Myxobolus cerebralis* a *Zschokkella nova*.

Parsimoniální analýza (viz. Obr. 7.) určila skupinu Myxozoa jako sesterskou vůči skupině Cubozoa. Tato sesterská pozice je podpořena 81 % bootstrapem. V rámci sledovaných myxosporeí je bazálním taxonem druh *Zschokkella nova*. Druhy *Ortholinea* sp. a *Myxobolus cerebralis* jsou oproti ML analýze postaveny na bazálnější úrovni. K těmto druhům tvoří sesterskou skupinu podpořenou středním bootstrapem (73%) druhy *Myxidium lieberkuehni*, *Unicauda* sp., *Henneguya* sp. a *Myxobolus* sp).

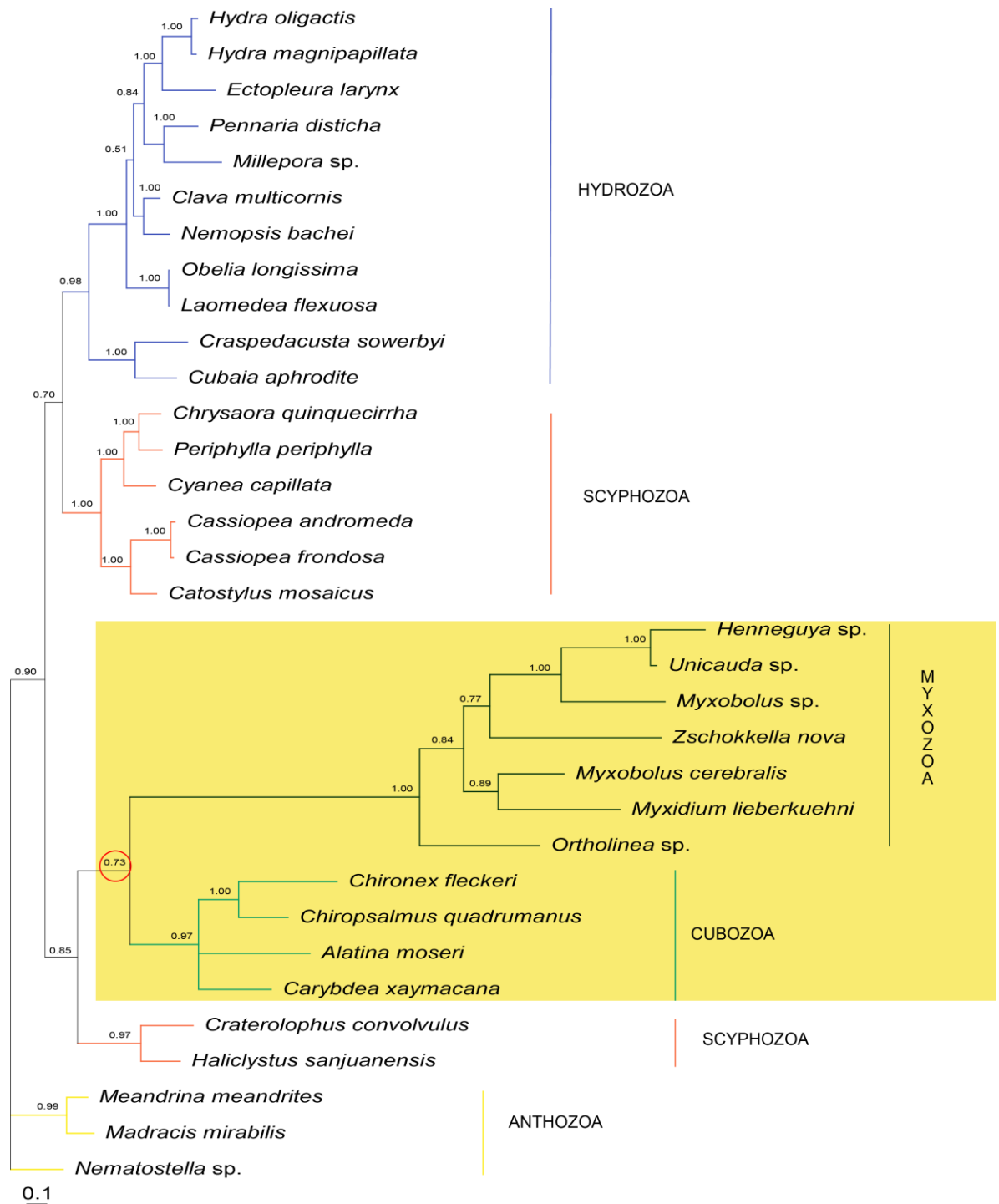
Bayesovská analýza (Obr. 8.) odpovídala co se týká postavení myxozoi v rámci žahavců topologii dosažené MP analýzou. Podpora větvení („posterior probability“) Myxozoa + Cubozoa byla 0.73. V rámci myxozoi byla potvrzena blízká příbuznost druhů *Myxobolus* sp., *Unicauda* sp. *Henneguya* sp., která byla podpořena maximální hodnotou nodální podpory. *Myxobolus cerebralis* klastroval s *Myxidium lieberkuehni* a bazální pozici zaujal druh *Ortholinea* sp.



Obrázek 6: Fylogenetické vztahy myxozoi v rámci žahavců. Vztahy odvozené metodou Maximum likelihood (ML). Hodnoty u uzlů udávají podporu větvení (bootstrap) vyšší jak 50%.



Obrázek 7: Konsenzuální fylogenetický strom definující vztahy myxozoi v rámci žahavců. Strom zkonstruován metodou Maximální parsimonie. Neuvedené bootstrapové hodnoty udávají podporu větvení nižší jak 50%.

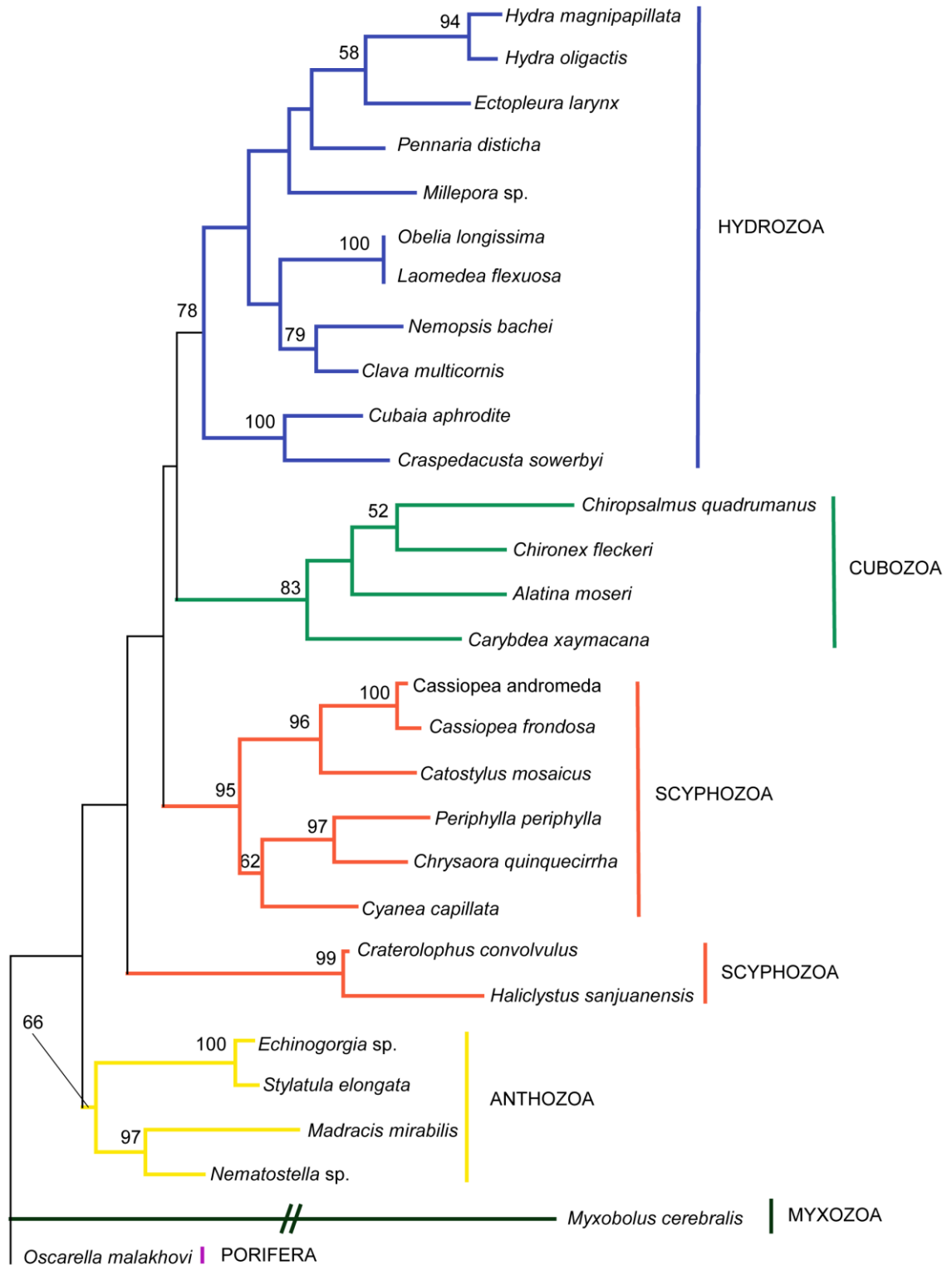


Obrázek 8: Fylogenetický strom definující vztahy myxozoi v rámci žahavců na základě analýzy rns odvozený Bayesovskou metodou. Čísla uvedená u uzlů udávají „posterior probabilities“ vyšší jak 0,5.

5.3.2 Analýza NADH 1

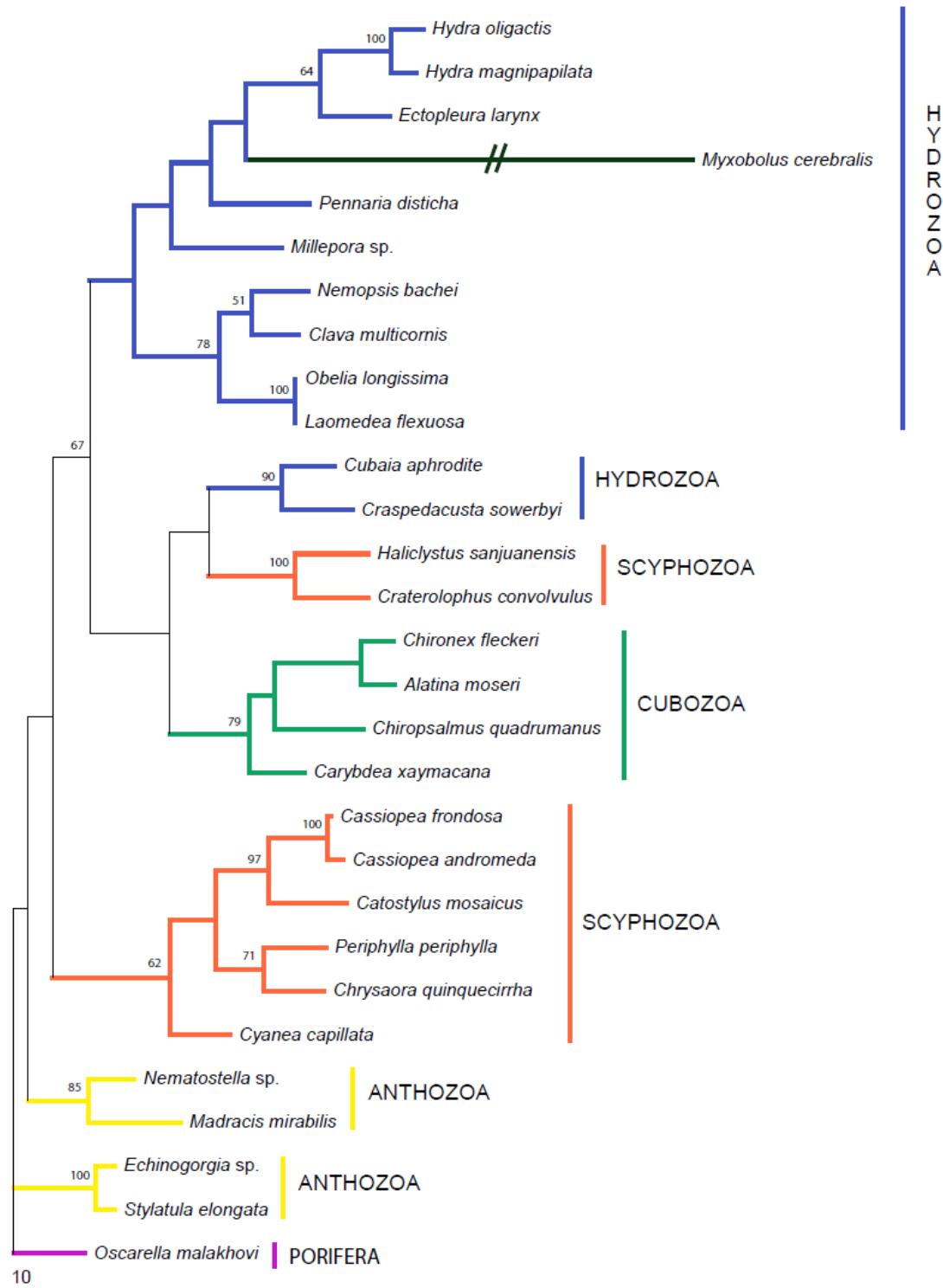
PCR s navrženými primery pro amplifikaci NADH1 genu myxosporeí nevedla k získání dalších NADH1 sekvencí myxosporeí. Oproti ribozomálním datům bylo v analýze NADH1 tedy využito pouze sekvence zástupce *Myxobolus cerebralis*, tudíž na základě tohoto genu nelze určit fylogenetické vztahy v rámci myxozoí. Byly opět provedeny tři fylogenetické analýzy (ML, MP, PB), které určily Myxozoa jako jeden z taxonů v rámci žahavců s relativně dlouhou větví naznačující vysokou sekvenční odlišnost (viz. Obr. 9,10,11). Délka větve zástupce *M. cerebralis* (Myxobolidae) byla u všech konsenzuálních stromů čtyřikrát zkrácena z důvodu viditelnosti v rámci délek všech ostatních větví.

ML metoda vyhodnotila Myxozoa jako bazální skupinu ležící u kořene stromu (viz. Obr. 9). MP naznačila pozici myxozoí v rámci hydrozoí (Cnidaria) (viz. Obr. 10). Představitel myxozoí *M. cerebralis* představuje v této pozici sesterský druh ke skupině *Ectopleura larynx*, *Hydra oligactis* a *Hydra magnipapillata*. Bayesovská analýza určila *M. cerebralis* jako jeden z taxonů v rámci polytomického větvení s ostatními podskupinami žahavců ze skupiny Medusozoa (viz. Obr. 11). Bayesovská podpora pro oddělení skupiny Medusozoa včetně Myxozoa od anthozoí je 0,68. Jako outgroup zde byla použita sekvence zástupce z mořských hub *Oscarella malachovi* (Porifera).

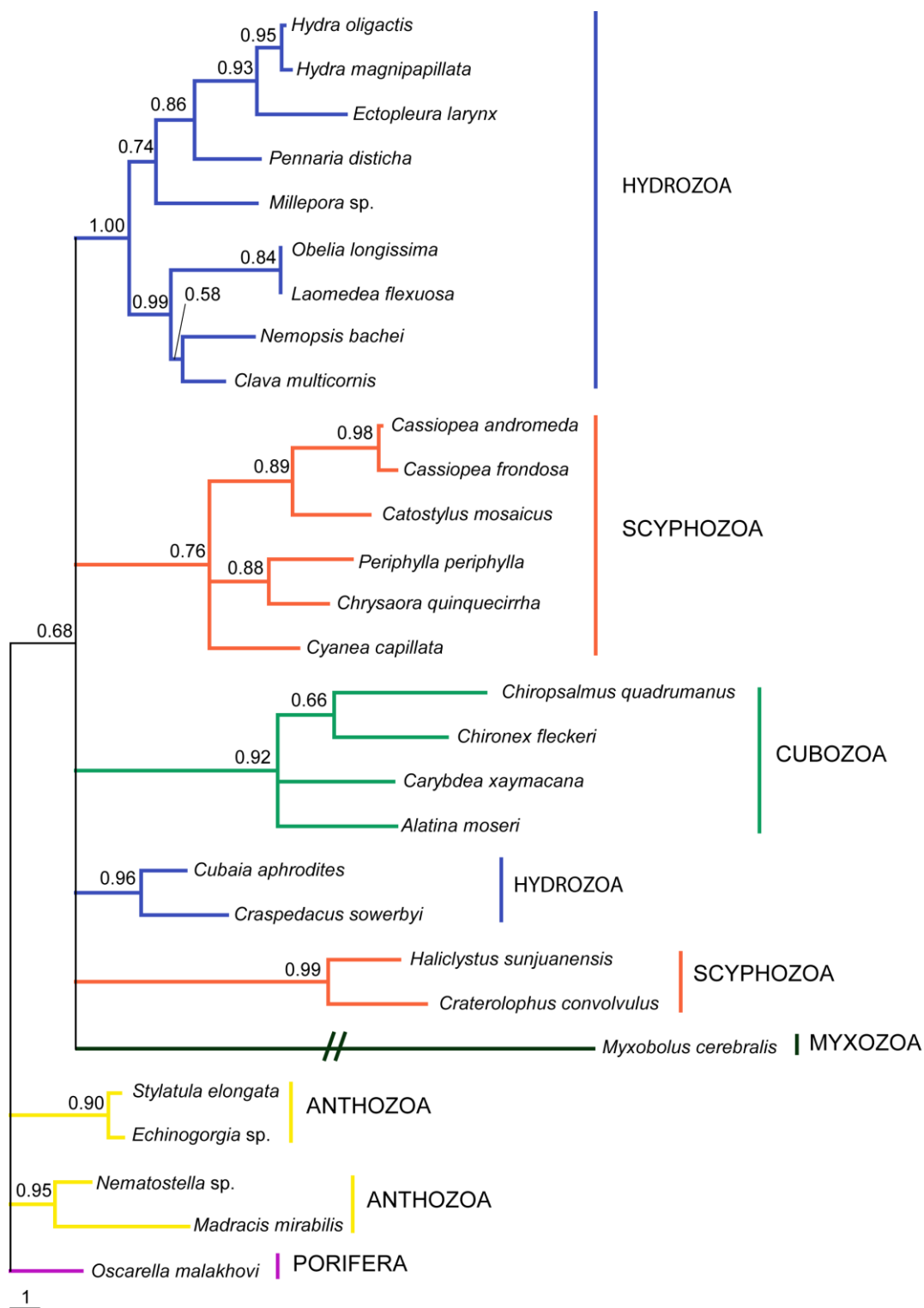


1

Obrázek 9: Fylogenetické vztahy myxozoi na základě analýzy NADH1 v rámci žahavců určené metodou Maximum likelihood. Hodnoty u uzlů udávají podporu větvení (bootstrap) vyšší jak 50%. Větev u *M. cerebralis* zkrácena 4 krát. Jako outgroup byl stanoven druh *O. malakhovi* (Porifera).



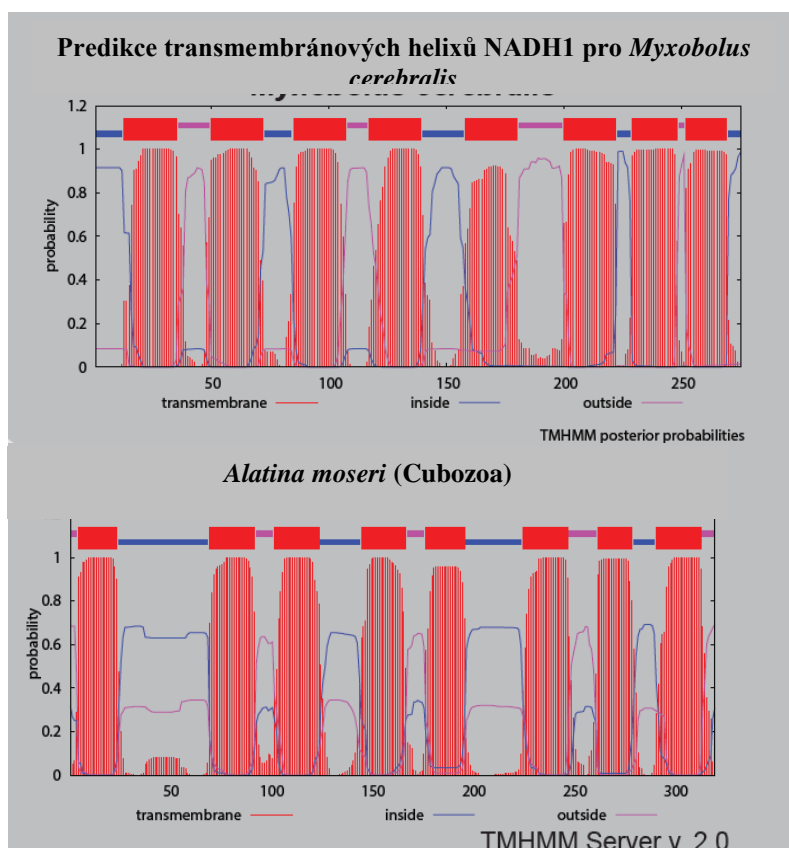
Obrázek 10: Fylogenetické vztahy myxozoi v rámci žahavců na základě analýzy NADH1 určené metodou maximální parsimonie. Hodnoty u uzlů udávají podporu větvení (bootstrap) vyšší jak 50%. Větev u *M. cerebralis* zkrácena 4 krát. Jako outgroup byl stanoven druh *O. malakhovi* (Porifera).



Obrázek 11: Fylogenetický strom vztahů myxozoi v rámci žahavců na základě NADH1 analýzy odvozený Bayesovskou metodou. Čísla uvedená u uzlů udávají „posterior probabilities“ vyšší jak 0,5. Větev u *M. cerebralis* zkrácena 4 krát. Jako outgroup byl stanoven druh *O. malakhovi* (Porifera).

5.4 Predikce transmembránových helixů

Relativně nízká homologie NADH1 genu s jinými NADH1 geny vedla k dodatečnému ověření přítomnosti transmembránových helixů tohoto proteinu. Analýza predikce pomocí programu TMHMM Server v. 2.0 (viz. Obr. 12) poukazuje na homologický transmembránový patern (vzor) proteinových helixů u *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa) a *Alatina moseri* (Cubozoa). Na Obr. 13 je srovnání výsledné analýzy u *M. cerebralis* a medúzy *Alatina moseri*.



Obr. 12: Homologické paternity transmembránového proteinu NADH1 u druhů *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa) a *Alatina moseri* (Cubozoa). Predikce topologie na základě skrytého Markov modelu (převzato z Fiala a kol. 2013).

6. DISKUZE

Na základě srovnání mitochondriálních genů žahavců a částečných genomových dat *Myxobolus cerebralis* byla nalezena homologie genu pro cytochrom b se zástupci žahavců (viz. Tab. 3). Nicméně po následném bližším prozkoumání se ukázalo, že se jedná s největší pravděpodobností o kontaminaci gram-negativní bakterií z rodu *Thauera*. Naproti tomu u NADH1 genu, který byl použit ve fylogenetických analýzách, nebyla zaznamenána vysoká homologie s částečným genomem *M. cerebralis*. Avšak fylogenetické analýzy potvrdily evoluci tohoto genu v rámci evoluce NADH1 genu žahavců. Navíc v blízkosti NADH1 byl u *M. cerebralis* odhalen mitochondriální rns gen. To podporuje mitochondriální původ homologu genu NADH1.

Byla identifikována pozice a pořadí dvou mitochondriálních genů u zástupce myxozoi. Pořadí genů je důležitým markerem pro zjišťování příbuzenských vztahů v rámci žahavců (Sinninger a kol. 2007). Shoda v sousední pozici genů rns a NADH1 u *M. cerebralis* a zástupců skupiny Octocorallia (Anthozoa) (viz. Obr. 5) naznačuje možnou příbuznost myxozoi s touto skupinou žahavců. Avšak dosavadní fylogenetické analýzy (Jiménez-Guri a kol. 2007, Nesnídal a kol. 2013, fylog. analýzy této bak. práce) potvrzují skutečnost, že skupina Myxozoa klastruje v rámci žahavců ke skupině Medusozoa. Nicméně, z hlediska výše uvedené homologie se zástupci anthozoi, se otevírá možnost nové teorie o původu myxozoi. Tato teorie, založená na zachovaném pořadí genů mezi myxozoi a zástupci octocorallií, by definovala Myxozoa jako prastarou skupinu žahavců, která se oddělila ještě před vznikem medusozoi. Ostatní žahavci ze skupiny Medusozoa, u kterých je pořadí genů změněné, mohly projít během evoluce zásadní evoluční změnou, která zapříčinila přeskupení genových segmentů v rámci mitochondriálního genomu (Brockman a kol. 2012). Tato změna u žahavců proběhla z hlediska celého mitochondriálního genomu (viz. Obr. 13, kapitola 8. Přílohy), kdy kromě přeskupování genů došlo zároveň i k linearizaci a fragmentaci u fylogeneticky mladších podskupin žahavců (Kayal a kol. 2012).

Příbuzenské vztahy vyplývající z provedených fylogenetických analýz dvou mitochondriálních genů ukazují nejednotnost a slabý fylogenetický signál těchto dvou markerů. Pokud je fylogeneze myxozoi založená na ribozomálních datech (rns), tak se Myxozoa větví uvnitř medusozoi. Ojedinelá vyšší bootstrapová podpora byla zaznamenána v MP analýze ve vztahu ke skupině Cubozoa (viz. Obr. 7). Tato pozice je v rozporu s topologií vzešlou z ML analýzy (viz. Obr. 6), která přiřadila Myxozoa jako sesterskou skupinu ke dvěma druhům scyphozoi. Nicméně nodální podpora této pozice je velmi nízká.

Analýzy provedené na protein-kódujících sekvencích genu pro NADH1 podporují podobně jako ribozomální analýzy to, že Myxozoa jsou v analýzách mitochondriálních genů z hlediska fylogeneze vysoce nestabilní. V případě NADH1 genu to může být ale výsledkem fylogenetického artefaktu, který je dán velmi dlouhou větví u *M. cerebralis*. Dlouhá větev naznačuje mnoho unikátních změn v proteinové sekvenci a tudíž problematickou fylogenetickou analýzu. Srovnávací studie Evanse a kol. (2010) potvrzuje námi pozorovaný problém nízkého fylogenetického signálu v případě NADH1 genu uvnitř stromu žahavců. Na druhou stranu překvapivým zjištěním je výsledek analýzy rns genu, která vedla k poměrně dobře resolvovanému stromu s dobře podpořenými nody. Věrohodnosti rns analýzy podporuje topologie stromu, která je shodná s analýzami založenými na mitochondriálních proteinových datech (Kayal a kol. 2013).

V průběhu bakalářské práce se ukázalo jako velmi problematické získání mitochondriálních genů myxozoi, a to i přes to, že byly k dispozici primery navržené na základě zjištěných mitochondriálních genů *M. cerebralis*. Úspěšně se podařilo získat pouze šest rns sekvencí myxozoi, která byla blízce příbuzná k *M. cerebralis*. Amplifikace v případě NADH 1 genu byla zcela neúspěšná. Tento fakt také potvrzují předchozí studie řešící problematiku amplifikovatelnosti protein-kódujících sekvencí (Cinková 2010; Fiala a Bartošová, 2010). Problematickou amplifikaci jsem se snažil řešit za použití modifikací PCR metody (Step-out PCR, Nested PCR), nicméně ani jedna z metod nevedla ke zvýšení úspěchu PCR metody. Pro fylogenetickou analýzu NADH 1 genu byla použita pouze sekvence zástupce *M. cerebralis* získaná z genomických dat. Nelze tedy posuzovat vztahy uvnitř skupiny Myxozoa na základě NADH1 genu a také vhodnost tohoto genu pro řešení vztahů v rámci myxozoi.

7. ZÁVĚR

Pořadí genů je důležitým markerem pro zjišťování příbuzenských vztahů v rámci žahavců (Sinninger a kol. 2007) a proto odhalení pořadí dvou mitochondriálních genů myxozoi může být důležitým zjištěním v pátrání po evolučním původu myxozoi. Analýza rns genu odhalila jeho relativně vysoký fylogenetický signál. Fakt, že se podařilo získat šest sekvencí tohoto genu od zástupců myxozoi, naznačuje do budoucna použitelnost rns jako markeru pro odhalování příbuzenských vztahů také v rámci myxozoi. Nezbytným předpokladem je testování alternativních primerů tak, aby se dosáhlo vyšší úspěšnosti v PCR amplifikaci.

8. ZDROJE

Anderson, F.E., Swofford, D.L. (2004). Should we be worried about long-branch attraction in real data sets? Investigations using metazoan 18S rDNA. *Molecular Phylogenetic Evolution*, pp. 440–451.

Barr, C.M., Neiman, M., Taylor, D.R. (2005). Review Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytologist* 168, pp. 39–50.

Bartholomew, J.L., Atkinson, S.D., Hallett S.L., Lowenstine, L.J., Garner, M.M., Gardiner, C.M., Rideout B.A., Keel, M.K., Brown, J.D. (2008). Myxozoan parasitism in waterfowl. *International Journal for Parasitology* 38, pp. 1199–1207.

Bartholomew, J.L., Rohovec, J.S., & Fryer J.L. (1989). *Ceratomyxa shasta*, a Myxosporean Parasite of Salmonids. U.S. Fish & Wildlife Service, National Fisheries Research Center.

Bartholomew, J.L., Wilson, J.C. (2002). Whirling Disease Reviews and Current Topics. *Proceedings of the 7th Annual Whirling Disease. Symposium 29*, pp. 262.

Birky, C.W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics* 35, pp. 125–148.

Brockman, S.A., McFadden, C.S. (2012). The mitochondrial genome of *Paraminabea aldersladei* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia) supports intramolecular recombination as the primary mechanism of gene rearrangement in octocoral mitochondrial genomes. *Genome Biology and Evolution*, pp. 994-1006.

Cinková, M. (2010). Assessment of the mitochondrial data for the phylogenetic relationships of Myxosporea. Bc. Thesis, in Czech. Faculty of Science, University of South Bohemia, 40p.

Diamant, A., Lom, J., Dyková, I. (1994). *Myxidium leei* n. sp., a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organism* 20, pp. 137–141.

Eiras, C.J. (2005). An overview on the myxosporean parasites in amphibians and reptiles. *Acta Parasitologica*, 50, pp. 267–275.

El-Matbouli, M., Fischer-Scherl, T., Hofmann, R.W., (1992). Present knowlndge on the life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some Myxosporea spp. important for freshwater fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2, pp. 367–402.

Evans, M.N., Holder, T.M., Barbeitos, S.M., Okamura, B., Cartwright, P. (2010). The Phylogenetic Position of Myxozoa: Exploring Conflicting Signals in Phylogenomic and Ribosomal Data Sets. *Molecular biology and evolution* 27, pp. 2733–2746.

Fiala, I. (2006). The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology* 36, pp. 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, pp. 228.

- Fiala, I., Bartošová-Sojková, P., Whipps C. (2014). Taxonomy, systematics and phylogeny within the Myxozoa, in: *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* edited by Okamura B., Gruhl A., Bartholomew J. Springer (submitted).
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, pp. 294–299.
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. (1996). SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny *Computer Applications in the Biosciences* 12, pp. 543–548.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G.D.D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18, pp. 4541–4550.
- Grell, K. G. (1973). *Protozoology*. Springer-Verlag. New York.
- Hanelt, B., Van Schyndel, D., Adema, C.M., Lewis, L., Loker, S.E. (1996). The phylogenetic position of *Rhopalura ophiocomae* (Orthonectida) based on 18S ribosomal DNA sequence analysis. *Molecular Biology and Evolution* 13, pp. 1187–1191.
- Hartikainen, H., Hrubl, A., Okamura, B. (2014). Diversification and repeated morphological transitions in ednoparasitic cnidarians (Myxozoa: Malacosporea). *Molecular phylogenetic and evolution*. (in press).
- Hastein, T., Lindstad, T. (1991). Diseases in wild and cultured salmon: possible interaction. *Aquaculture* 98, pp. 277–288.
- Holland, J.W., Okamura, B., Hartikainen, H., Secombes, C.J. (2011). A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proceedings of the Royal Society B* 278, pp. 546–553.
- Jiménez-Guri, E., Philippe, B., Okamura, B., Holland, H.W.P. (2007). *Buddenbrockia* Is a Cnidarian Worm. *Science* 317, pp. 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 Research* 30, pp. 3059–3066.
- Kayal, E., Roure, B., Philippe, H., Collins, G.A., Lavrov, V.D. (2013). Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC Evolutionary Biology* 13, pp. 5.
- 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., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M.E., Xiao, C. (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48, pp. 395–413.
- Kent, M.L., Poppe, T.T. (1988). Diseases of netpen-reared salmonid fishes. Pacific Biological Station, Nanaimo, BC., pp. 293.

- Liu, Y., Whipps, C.M., Gu, Z.M., Juany, M.J., He, C., Yang, H.L., Molnár, K. (2013). *Myxobolus musseliusae* (Myxozoa: Myxobolidae) from the gills of common carp *Cyprinus carpio* and revision of *Myxobolus dispar* recorded in China. *Parasitology Research* 112, pp. 289–296.
- Lom, J. (1996) Prvoci kmene Myxozoa novou skupinou vícebuněčných parazitů. *Vesmír* 75, pp. 146.
- Lom, J., Dyková, I. (1992). Fine Structure of *Triactinomyxon* Early Stages and Sporogony: Myxosporean and Actinosporean Features Compared. *The Journal of Protozoology* 39, pp. 16–27.
- Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica* 53, pp. 1-36.
- Lom, J., Dyková, I. (1992). Protozoan parasites of fishes. Elsevier Science, Amsterdam.
- Lom, J., Noble E.R., (1984). Revised classification of the Myxosporea Bütschli, 1881. *Folia Parasitologica* 31, pp. 193–205.
- Lymberry, P. (2002). In too deep – the welfare of intensively farmed fish. *Compassion in World Farming*, Petersfield, Hampshire.
- Marechal-Drouard, L. (2012) *Mitochondrial Genome Evolution*, 1st Edition, Academic Press, pp. 215.
- Margulis, L., Schwarz, K. (1998). Five kingdoms, an illustrated guide to the phyla of life on earth. 3rd Edition. W. H. Freeman and Company. New York.
- Markiw, M.E., Wolf, K. (1983). *Myxosoma cerebralis* (Myxozoa: Myxosporea) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubicid worm (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *Journal of Protozoology* 30, pp. 561–564.
- Moller, S., Croning, M.D.R., Apweiler, R. (2001). Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17, pp. 646–653.
- Monteiro, S.A., Okamura, B., Holland, H.W.P. (2002). Orphan Worm Finds a Home: *Buddenbrockia* is a Myxozoan. *Molecular Biology and Evolution* 19, pp. 968–971.
- Nesnidal P.M., Helmkampf, M., Bruchhaus, I., El-Matbouli, M., Hausdorf, B. (2013). Agent of Whirling Disease Meets Orphan Worm: Phylogenomic Analyses Firmly Place Myxozoa in Cnidaria. *PLoS ONE* 8, p. 1.
- 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, pp. 215–223.
- Palumbi, S.R. (1996). In *Molecular Phylogenetics* (eds. Hillis, D.M., Moritz, C. & Mable, B.K.). Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, pp. 205–247.

- Poulin, R. (2007). *Evolutionary Ecology of Parasites*, 2nd ed. Princeton University Press, Princeton, NJ. pp. 332.
- 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, pp. 159–164.
- Rambaut, A. (2009). FigTree, ver. 1.3.1. [Online]. Available: <http://www.tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rigos, G., Katharios, P. (2010). Pathological obstacles of newly introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20, pp. 47–70.
- Siddall, M. E., Martin, D.S., Bridge, D., Cone, D.M., Desser, S.S. (1995). The demise of a phylum of protists: Myxozoa and other parasitic Cnidaria. *Journal of Parasitology* 81, pp. 961–967.
- Siddall, M. E., Whiting, F.M. (1999). Long-branch abstractions. *Cladistics* 15, pp. 9–24.
- Sinniger F., Chevaldonne P., Pawlowski J. 2007. Mitochondrial genome of *Savalia savaglia* (Cnidaria, Hexacorallia) and early metazoan phylogeny. *Journal of Molecular Evolution*. 64, pp. 196–203.
- Smothers, J.F., Dohlen C.v.D., Smith, Jr.L.H., Spall, R.D. (1994). Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science* 265, pp. 1719–1721.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, pp. 2688–2690.
- Sterud, E., Forseth, T., Ugedal, O., Poppe, T.T., Jørgensen, A., Bruheim, T., Fjeldstad, P.H., Mo, A.T. (2007). Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Diseases of aquatic organisms* 77, pp. 191–198.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP* – Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) version 4. Sunderland, MA: Sianuer Associates.
- Štolc, A. (1899). Actinomyxidies, nouveau groupe de Mesozoaires parent des Myxosporidies. *Bulletin International de l'Academie des Sciences de Boheme* 22, pp. 1–12.
- Théodoridès, J., Pujol, P., Neyrand-de-Leffemebr, F., Delso, M. (1981). New cases of testicular parasitism of amphibians by myxosporideans of the genus *Myxobolus*. *Bulletin de la Société zoologique de France* 106, pp. 386.
- Wahli, T., Bernet, D., Steiner, A.P., Schmidt-Posthaus, H. (2007). Geographic distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fish in Weiss revers: an update. *Aquatic Science* 69, pp. 3–10.

Weill, R. (1938). L'interprétation des Cnidosporidies et la valeur taxonomique de leur cnidome. Leur cycle comparé à la phase larvaire des Narcomeduses Cuninides. Travaux de la Station Zoologique de Wimereux 13, pp. 727–744.

White, D.J., Wolff, J.N., Pierson, M., Gemmell, N.J. (2008). Review revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology* 23, pp. 4925–4942.

Whittaker, H.R. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science* 163, pp. 150–160.

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, pp. 164–169.

9.PŘÍLOHY

Tabulka 4: Tabulka protokolů PCR. Definice kroků (1: Počáteční denaturace; 2: Denaturace; 3: Nasedání primerů; 4: Extenze/Elongace; 5: Finální elongace; 6: Chlazení). Pro Step-out PCR kroky 6-9 představují druhý cyklus PCR.

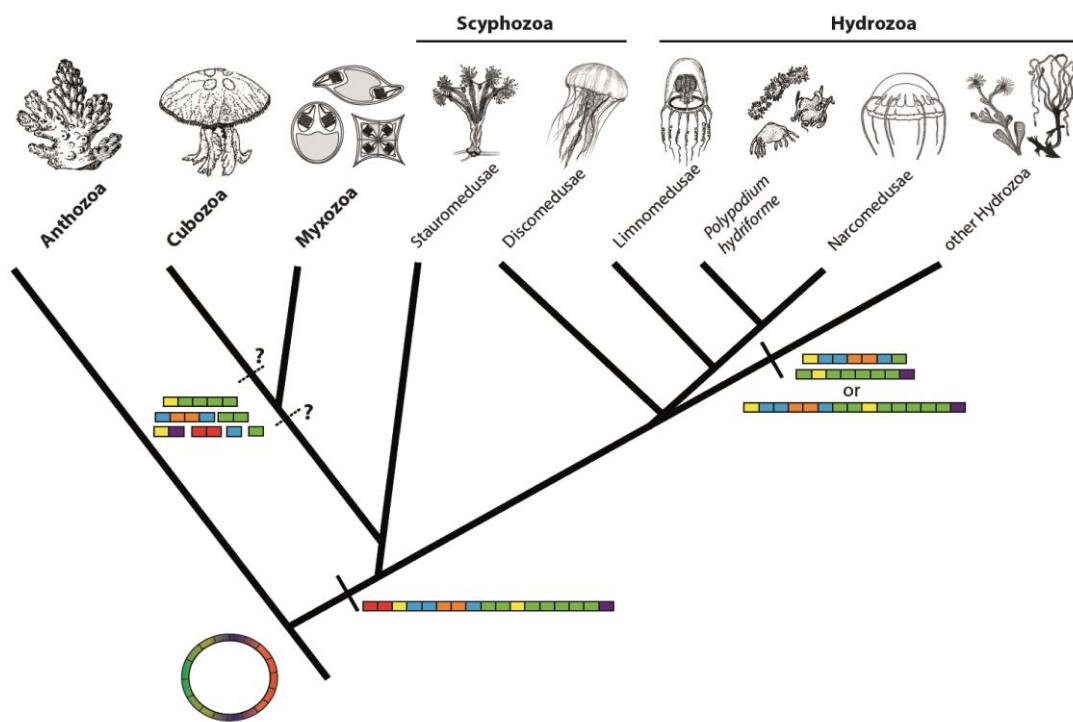
Kroky PCR cyklu	Typ PCR			
	A	B	C	D
	PCR s RedTaq polvm.	Titanium PCR	Nested PCR	Step-out PCR
1	94°C - 3 min	94°C - 3 min	94°C - 3 min	94°C - 2 min
2	94°C - 1 min	94°C - 1 min	94°C - 1 min	94°C - 1 min
3	48°C - 1 min	53°C - 1 min	48°C - 1 min	30°C - 2 min
4	72°C - 40 sec	68°C - 2 min 30 sec	72°C - 40 sec	72°C - 8 min
5	72°C - 10 min	68°C - 10 min	72°C - 10 min	72°C - 2 min (přidány primery)
6	4°C - ∞	4°C - ∞	4°C - ∞	94°C - 20 sec
7				55°C - 20 sec
8				72°C - 2 min 30 sec
9				72°C - 10 min
Cyklování	2-4 krok 30x	2-4 krok 30x	2-4 krok 30x	6-9 krok 30x
Množství komponent	16,5 ul H ₂ O	7,35 ul H ₂ O	A/B	A/B
	2,5 ul 10x buffer	1 ul titanium buffer	A/B	A/B
	2 ul dNTP _s	0,2 ul dNTP _s	A/B	A/B
	1 ul reverse primer	0,2 ul reverse primer	A/B	A/B
	1 ul forward primer	0,2 ul forward primer	A/B	A/B - použit Step-out 3 primer
	1 ul RedTaq polymerase	0,05 ul titanium polymerase	A/B	A/B
	1 ul template	1 ul template	A/B	A/B
Celkový objem reakce	25 ul	10 ul	25 ul/10 ul	25 ul/10 ul

Tabulka 5: Seznam použitých primerů včetně sekvencí. Primery M13-F/M13-použity k sekvencování zaklovaného PCR produktu ve vektoru (viz. podkapitola 3.4).

Primer	Cílový gen	Sekvence (5' → 3')	Odkazy
rns88-F	12S rDNA	GGATTAGAKACCCWKGTTADTC	
rns108-R	12S rDNA	GAHTACMWGGGTMTCTAATCC	
rns660-F	12S rDNA	TAAGTCGWAACMWWGTAGG	
rns677-R	12S rDNA	CCTACBWKGTTCGACTTA	
nd1-82-F	NADH 1	GGTGTTTTACAAAATAGAAAGG	
nd1-620-R	NADH 1	TCCATCTCAAATAATCAAATGG	
nd1-82nonsp-F	NADH 1	GGNGTNCNTNCARAAAYCGNAARGG	
nd1-620nonsp-R	NADH 1	TCCATYTCRAARTARTCRAANGG	
nd1-598nonsp-F	NADH 1	CCNTTYGAYTAYTTYGARATGGA	
LCO149-F	COX 1	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer a kol. 1994
HCO-R	COX 1	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer a kol. 1994
16S-H	16S rDNA	GACTGTTTACAAAAACATA	Palumbi a kol. 1996
16S-L	16S rDNA	TAGGGTGGCAATGTGAATCCAGAGTC	Palumbi a kol. 1996
M13-F	lacZ	TGTAACACGACGGCCAGT	
M13-R	lacZ	CAGGAAACAGCTATGACC	
12S-cnid-F	12S rDNA	AAGTGCCAGCAGACGCGGT	
12S-cnid-R	12S rDNA	CTCACTATGTTACGACTT	
12S-myxo-F	12S rDNA	GMTACTYGGRGARGTA	
12S-myxo-R	12S rDNA	GATTACTTTAGARTAC	

Tabulka 6: Seznam použitých vzorků včetně jejich identifikačního čísla a lokality sběru. (převzato z kolekce Laboratoře rybí protistologie).

Vzorek	Číslo	Hostitel	Lokalita sběru/Dovozce
<i>Auerbrachia pulchra</i>	404	<i>Coryphaenoides rupestris</i> (218)	Skotsko 2004
<i>Ceratomyxa</i> sp.	418	<i>Gadus morhua</i> (172)	Skotsko 2004
<i>Henneguya</i> sp.	1597	<i>Gnathonemus petersii</i> GP10, gills	aquarium.cz
<i>Chloromyxum schulmani</i>	1537	SA137, 2	South Africa
<i>Kudoa crumena</i> (sp.)	640	<i>Thunnus maccoyii</i>	Australie Port Lincoln
<i>Kudoa</i> sp.	384	<i>Thunnus maccoyii</i>	Tasmánie 2004
<i>Myxidium</i> sp.	412	<i>Coryphaenoides rupestris</i> (36)	Skotsko 2004
<i>Myxobolus pseudodispar</i>	977	<i>Vimba vimba</i>	Mikuláš Oros/Dunaj, Štúrovo, SR
<i>Myxobolus</i> sp.	173	Čína štíhlý	x
<i>Myxobolus</i> sp.	175	Čína, <i>Aristichthys nobilis</i> , gall	x
<i>Myxobolus</i> sp.	1207	<i>Bufo maculatus</i> C45/09, gb	Kamerun
<i>Ortholinea</i> ?	1435	<i>Symphodus mediterraneus</i> , CH 77, urine	Croatia - Veruda
<i>Palliatius</i> sp.	424	<i>Alepocephalus grandis</i> (58)	Skotsko 2004
<i>Thelohanellus</i> sp.	751	<i>Carassius auratus</i>	M. Caffara/Itálie
<i>Zschokkella nova</i>	664	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Vrkoč, Pohořelice
<i>Zschokkella nova</i> (spory)	665	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Vrkoč, Pohořelice
<i>Myxobolus</i> sp.	1208	<i>Bufo maculatus</i> C69/09, testes	Kamerun
<i>Unicauda</i> sp.	1572	<i>Gnathonemus petersii</i> GP6, kidney	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1573	<i>Gnathonemus petersii</i> GP6, ub	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1574	<i>Gnathonemus petersii</i> GP6, spleen	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1575	<i>Gnathonemus petersii</i> GP6, gb	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1576	<i>Gnathonemus petersii</i> GP6, liver	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1578	<i>Gnathonemus petersii</i> GP7, spleen	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1570	<i>Gnathonemus petersii</i> GP6, intestine	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1594	<i>Gnathonemus petersii</i> GP9, gb	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1593	<i>Gnathonemus petersii</i> GP9, intestine	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1599	<i>Gnathonemus petersii</i> GP10, intestine	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1596	<i>Gnathonemus petersii</i> GP10, spleen	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1588	<i>Gnathonemus petersii</i> GP9, kidney	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1581	<i>Gnathonemus petersii</i> GP7, gb	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1595	<i>Gnathonemus petersii</i> GP10, liver	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Henneguya</i> sp., <i>Unicauda</i> sp.	1591	<i>Gnathonemus petersii</i> GP9, gills	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1580	<i>Gnathonemus petersii</i> GP7, kidney	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1592	<i>Gnathonemus petersii</i> GP9, liver	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1603	<i>Gnathonemus petersii</i> GP10, kidney	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Unicauda</i> sp.	1601	<i>Gnathonemus petersii</i> GP10, gb	aquarium.cz (JV Asie)
<i>Parvicapsula minibicornis</i>	1614	x	x
<i>Zschokkella nova</i> (spory)	586	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Třeboň (Rožmberk)
<i>Chloromyxum fluviatile</i> , spory	705	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Vrkoč, Pohořelice
<i>Sphaeromyxa</i> sp.1A	310	<i>Melanogrammus aeglefinus</i> 185	Skotsko 2003
<i>Myxidium</i> sp. 2	308	<i>Callionymus lyra</i> 216, 333	Skotsko 2003
<i>Myxidium</i> sp. 3	309	<i>Helicolenus dactylopterus</i> 422	Skotsko 2003
<i>Chloromyxum leydigi</i>	314	<i>Scyliorhinus laniculus</i> 140	Skotsko 2003
<i>Ceratomyxa</i> sp. 1	729	<i>Lophius piscatorius</i> 11	Norsko, Sturhelen
<i>Sorocimyxa fegati</i>	728	<i>Sorex araneus</i> 57	Jižní Čechy
<i>Henneguya zschokkei</i>	1612	x	x
SST-srdce <i>Henneguya</i>	924	<i>Cynoscion nebulosus</i>	Charleston/2009
<i>Polypodium hydriforme</i> (chapadla)	707	<i>Acipenser guldenstadti</i>	Rusko
<i>Ceratomyxa</i> sp.	425	<i>Synphobranchus kaupi</i> (336)	Skotsko 2004
<i>Sphaerospora testicularis</i>	1613	x	x
<i>Palliatius</i> sp.	424	<i>Alepocephalus grandis</i> (58)	Skotsko 2004



Obr. 13: Evoluce mitochondriálního genomu u žahavců (Cnidaria) (převzato z Fiala a kol. 2013).