

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Fylogeneze myxozoi založená na genech specifických  
pro žahavce**

Diplomová práce

**Bc. Jiří Kyslík**

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

Konzultant mimo univerzitu: Ashlie Hartigan, Ph.D.

České Budějovice 2016

Kyslík, J., 2016: Fylogeneze myxozoi založená na genech specifických pro žahavce. Phylogeny of Myxozoa based on cnidarian specific genes. [Diplomová práce. MSc. Thesis, in Czech.] – 72 pp., Faculty of science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

**Annotation:**

Current myxozoan phylogeny relies mostly on single 18S rDNA or concatenated analysis of a limited number of 18S + 28S rDNA and exceptionally EF-2 gene sequences. Although these widely-used markers support particular phylogenetic relationships, they are not sufficient to reconstruct the pattern of some early branching nodes, important for the understanding of the main phylogenetic trends of Myxozoa. The present study describes new potential phylogenetic markers – nematogalectin genes, which are unique cnidarian-specific genes. Phylogenetic reconstruction based on nematogalectins showed congruency with 18S rDNA based phylogenies and concatenated analysis of 18S rDNA and nematogalectins revealed better support of early branching nodes in the myxozoan tree. Recently published and newly obtained data of these cnidarian-specific genes represent important insights into the phylogeny of Myxozoa.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí, archivovaných 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 dne: 22. 4. 2016

Podpis: .....

## **Poděkování**

V první části bych chtěl poděkovat svému školiteli Dr. Ivanu Fialovi, za perfektní vedení diplomové práce, za jeho cenné rady, připomínky a hlavně za velmi přátelský přístup. Dále můj velký dík patří konzultantce mé diplomové práce Dr. Ashlie Hartigan, za konzultace a komentáře během vypracovávání této práce, jakožto i ostatním členům Laboratoře rybí prostistologie za přátelskou atmosféru. Neméně bych chtěl poděkovat svým kolegyním, zejména Bc. Janě Müllerové dále Bc. Anetě Maršíkové a Bc. Tereze Tomkové, za konzultace, formální korektury a za jejich bezednou podporu. Poslední a největší dík patří mé rodině, která mě během mého magisterského studia morálně i věcně podporovala.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Obecná charakteristika myxozoi</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Morfologická charakterizace myxozoi</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Životní cyklus myxozoi</b> .....	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Taxonomie a nomenklatura myxozoi</b> .....	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>Patogenita a ekonomický význam myxozoi</b> .....	<b>10</b>
<b>6</b>	<b>Fylogenetické vztahy myxozoi v rámci metazoi</b> .....	<b>12</b>
<b>7</b>	<b>Fylogenetické vztahy v rámci myxozoi</b> .....	<b>15</b>
<b>8</b>	<b>Fylogenetické markery, problematika a jejich využití u myxozoi</b> .....	<b>18</b>
<b>9</b>	<b>Taxonomically restricted genes u žahavců a myxozoi</b> .....	<b>20</b>
<b>10</b>	<b>Nematogalectiny jako TRGs u žahavců a myxozoi</b> .....	<b>24</b>
<b>10</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>26</b>
<b>11</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>27</b>
11.1	Materiál .....	27
11.2	BLAST analýza.....	27
11.3	Navrhování primerů .....	27
11.4	Amplifikace vybraných genů .....	28
11.5	Analýza senzitivity PCR pro nematogalectin-related .....	28
11.6	Gelová elektroforéza a izolace produktů .....	29
11.7	Klonování PCR produktů a izolace plazmidové DNA.....	29
11.8	Sekvenování cílových genů .....	29
11.9	Fylogenetické analýzy .....	30
11.10	Topologické testy pro nematogalectin-related .....	30
<b>12</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>28</b>
12.1	BLAST analýza.....	32
12.2	Fylogenetická analýza genu pro nematogalectin-related protein .....	32

12.3 Fylogenetická analýza genu pro nematogalectin-A protein .....	35
12.4 Konkatenovaná analýza 18S rDNA + Ngal-A + Ngal-related .....	37
12.5 Společná analýza genů Ngal-Rel, Ngal A a Ngal C žahavců a myxozoi.....	40
12.6 Testování topologie analýzy pro nematogalectin-related .....	42
12.7 Testování senzitivity PCR pro nematogalectin-related .....	42
<b>13 Diskuze.....</b>	<b>29</b>
<b>14 Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>15 Zdroje.....</b>	<b>50</b>
<b>16 Přílohy.....</b>	<b>59</b>

# 1 Obecná charakteristika myxozoi

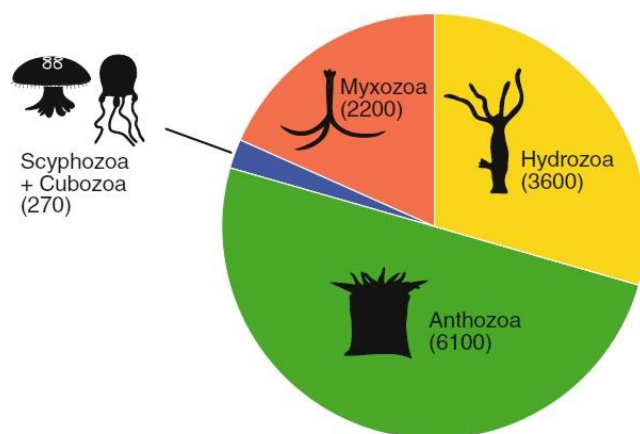
Mezi recentní žahavce je dnes řazena jedna z nejvíce morfologicky i ekologicky modifikovaných skupin organismů, Myxozoa. Myxozoa jsou obligátní mnohobuněčnou parazitickou skupinou přečnávající svou diverzitou některé známé skupiny žahavců (viz Obr. 1), kupříkladu volně žijící zástupce skupiny Scyphozoa (Zhang 2011). Podle počtu aktuálně popsanych zástupců, Myxozoa čítají kolem 2200 druhů (Lom a Dyková 2006). Nicméně skutečný počet druhů je pravděpodobně mnohem vyšší.

Řada druhů stále čeká na své objevení a také nedávno objevená skrytá diverzita u mořské linie Malacospora napovídá, že Myxozoa mohou být druhově nejbohatší skupinou žahavců (Bartošová-Sojková a kol. 2014).

Tato linie parazitů, jejíž vznik a vývoj byl způsoben adaptivní radiací dávného předka žahavců (Fiala a kol. 2015b), který se přizpůsobil parazitickému způsobu života, střídá ve svém životním cyklu dva různé hostitele. Jejich typickými hostiteli (mezihostiteli) jsou různé druhy sladkovodních a mořských ryb. Napadají ale také často obojživelníky a výjimečně plazy, ojediněle ptáky a savce. Během vývojového cyklu využívají jako definitivního hostitele, v němž probíhá pohlavní rozmnožování, zástupce z mořských mnohoštětinatců (Polychaeta) a sladkovodních máloštětinatců (Oligochaeta), z nichž nejběžnějšími bývají zástupci nítěnek (Tubificida).

Tato skupina od svého objevu (Jurine 1825) prošla značnými taxonomickými přesuny v systému eukaryotických organismů. Myxozoa byla považována po dlouhou dobu za prvoky a až molekulárně taxonomické studie prokázaly jejich „metazoární“ původ (Wolf a Markiw 1984). Současná taxonomie myxozoi je i přes mnohé změny stále v rozporu s jejich fylogenezí. Hlavním problémem v klasifikaci těchto organismů je existence parafyletických či polyfyletických rodů, jejichž zástupci jsou často zcela nepříbuzní, avšak morfologicky podobní.

Z ekologického pohledu, Myxozoa jakožto parazité jedné z druhově nejpočetnějších skupin obratlovců, osídlila různé typy biotopů od sladkovodních přes mořské až po brakické



Obr. 1: Zastoupení druhů u žahavců včetně myxozoi. Převzato z B. Okamura et al. (eds.), Myxozoan Evolution, Ecology and Development, DOI 10.1007/978-3-319-14753-6\_1, © Springer International Publishing Switzerland 2015.

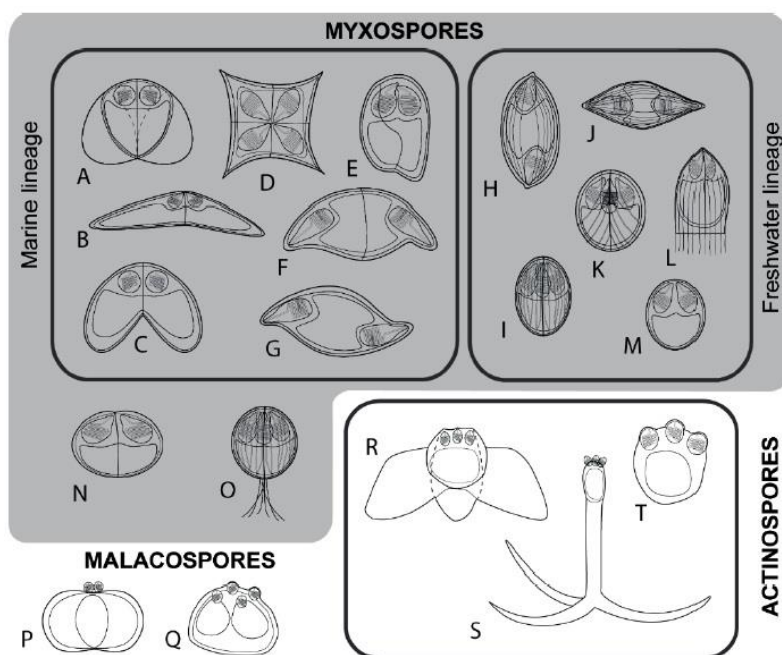
oblasti (Bartošová a kol. 2013; Reed a kol. 2003). Podle geografického rozšíření jsou Myxozoa kosmopolitní skupinou, která byla objevena jak v polárních tak i v tropických oblastech světa (Katharios a kol. 2011; Kodádková a kol. 2014). Většina druhů svému hostiteli významně neškodí a běžně se vyskytují v případech koinfekce bez zjevných patologických účinků. Některé druhy přesto způsobují vážné ekonomické ztráty v rybářském průmyslu z důvodu jejich zvýšené patogenity u chovných ryb. To má za následek negativní ovlivnění produktivity obchodu s rybami v určitých oblastech (Sitjà-Bobadilla a kol. 2015).

## 2 Morfologická charakterizace myxozoi

Hlavní morfologické znaky myxozoi se nachází na typickém stádiu – myxospoře, jenž je nositelem vlastního patogenního agens (sporoplasmy) myxozoi. Myxospora je útvar, který se skládá z chlopní neboli valvul, které mohou být u spory buďto dvě, tři čtyři a výjimečně i více. Podle počtu těchto chlopní mají spory myxozoi buďto bilaterální, triradiální či tetraradiální souměrnost a jsou taxonomicky členěny do dvou řádů odvozených od výše zmíněných typů spory: Bivalvulida (Shulman 1959) a Multivalvulida. Z ultrastrukturního hlediska mají buňky myxozoi v cytoplasmě volně rozmístěné ribozomy, mitochondrie s kristami tubulárního, diskovitého nebo plochého typu.

Zásobními látkami jsou tuk nebo glykogen (Lom a Dyková 2006). Charakteristickým znakem myxospory je pólový váček představující synapomorfní strukturu s knidocyty žahavců (Siddall a kol. 1995). Pólové váčky, které jsou u myxozoi ve spoře nejčastěji ve dvojici či čtveřici, obsahují vymrštitelná vlákna sloužící k přichycení k hostiteli (Lom 1990; Siddall a kol. 1995). U žahavců mají tato filamenta po kontaktu za následek intoxikaci kořisti (Kass-Simon a Scappaticci 2002). Charakter pólových váčků jako je jejich velikost, tvar, úhel a pozice uvnitř spory zároveň slouží jako důležitý taxonomický znak pro klasifikaci druhů myxozoi (Lom a Arthur 1989).

Myxozoa lze tedy charakterizovat jako mikroskopické mnohobuněčné parazity, které z hlediska rozměru a morfologie připomínají Protista, přesto mají některé apomorfie (diferenciace buněk, desmosomu podobné buněčné spoje), které jsou společné pro celou živočišnou říši (Smothers a kol. 1994). Od běžné buněčné typizace eukaryot se Myxozoa liší v absenci bičků a centriol, jejichž nepřítomnost lze odvodit ze sekundární ztráty během evoluce (Lom a Dyková 2006). Některé znaky myxozoi však můžeme nalézt i u jiných skupin organismů mimo metazoa.



Obr. 2: Morfotypy myxozoi. (A-O) Myxosporový morfotyp z vybraným morfotypem z každého fylogenetického kládu. (A) *Bipteria*, (B) *Ceratomyxa*, (C) *Ceratonova*, (D) *Kudoa*, (E) *Parvicapsula*, (F) *Enteromyxum*, (G) marine *Myxidium*, (H) freshwater *Myxidium*, (I) sladkovodní *Chloromyxum*, (J) *Myxidium lieberkuehni*, (K) *Chloromyxum careni*, (L) *Hoferellus*, (M) *Myxobolus*, (N) *Sphaerospora*, (O) mořské *Chloromyxum*. (P-Q) Malacosporean morphotypes, (P) fishmalacospore of *Tetracapsuloides*, (Q) malacospory *Tetracapsuloides* ze sladkovodních mechovok (R-T) Běžný aktinosporeový morfotyp (R) aurantiactinomyxon, (S) triactinomyxon, (T) tetractinomyxon.



Příkladem je parazitická skupina Microsporidia (Fungi, Opisthokonta), se kterou byla Myxozoa v minulosti chybně klasifikována do společného taxonu Cnidosporidia (Grell 1973). Společným znakem myxozoií a mikrosporidií je přítomnost spory s vystřelovacím aparátem ve vývojovém cyklu, jejíž funkce je však u mikrosporidií zcela odlišná.

Takto definovaná morfologie je charakteristická pro myxosporeovou a malacosporeovou fázi životního cyklu myxozoií, které se odehrávají v mezihostiteli. Jednotlivé základní morfotypy myxospor a malacospor jsou zobrazeny na Obr. 2.

U definitivního hostitele dochází k tvorbě zcela odlišného morfotypu spory avšak funkčně analogického. Jedná se o aktinosporu, která je triradiálně symetrická. Tento typ symetrie vytváří u aktinospor typický tvar připomínající tvar „kotvy“ jako je kupříkladu triactinomyxon druhu *Myxobolus cerebralis* (Hedrick a kol. 2002), či tzv. neoactinomyxon, tetractinomyxon, aurantiactinomyxon (el-Mansy a kol. 1998) viz Obr. 2. Zároveň uvnitř aktinospor je přítomno větší množství infekčních buněk oproti myxosporám (Lom a Dyková 1992).

Kromě spor Myxozoa vytváří také vegetativní stádia (plasmodia) dosahující často makroskopických rozměrů. Vnitřní struktura plasmodií se skládá z vegetativních jader a různého počtu generativních buněk. Během vývoje plasmodií se objevují unikátní morfologické útvary tzv. buňka v buňce (cell-in-cell), kdy jedna buňka obklopí druhou a vzniká primární buňka s vnitřní sekundární buňkou. Často sekundární buňka obsahuje i terciární a ta následně kvadrární buňku, obdoba ruské matrjošky. Podle lokalizace v hostiteli rozlišujeme plasmodia histozoická (ve tkáních) a coelozoická (v dutinových orgánech). Histozoická plasmodia mívají často podobu makroskopických cyst, které v pozdější fázi vývoje dávají vznik sporám (Lom a Dyková 2006).

Evoluční linie Malacosporea, parazitující u sladkovodních mechovek (Bryozoa) se vyznačuje zcela odlišnou morfologií oproti linii Myxosporea. Ačkoli některé morfologické znaky malacosporeí korelují se znaky myxosporeí (chlopně spory) jsou zde některá specifika naznačující, že Malacosporea jsou evolučně starší vývojovou linií. Mezi některé z těchto znaků řadíme absenci diference spory během životního cyklu v mezihostiteli nebo zachování rozsáhlých vrstev buněk se spojovacími komplexy (junctional complexes) (Hartikainen a kol. 2014). Především jsou to ale pro Malacosporea typická stádia, která připomínají červovitý organismus u druhu *Buddenbrockia plumatellae*. Tohoto červa připomínající stádium má čtyři svazky podélné svaloviny a je zároveň schopné pohybu uvnitř coelomu mechovek (Gruhl a Okamura 2012). U jiných druhů malacosporeí byly namísto červovitých stádií popsány váčkovité útvary (sac stages) a to u druhů *B. allmani*, *B. plumatellae* a *Tetracapsuloides bryosalmonae*

(Bartošová-Sojková a kol. 2014; Hartikainen a kol. 2014).

Recentní studie naznačují, že u dosud velmi druhově chudé skupiny Malacosporea je předpokládána vysoká „skrytá“ diverzita na základě získávání stále většího počtu nepopsaných druhů, včetně hypotézy jejich existence v mořských habitatech (Bartošová-Sojková a kol. 2014). Odhalování diverzity malacosporeí může přinést nové poznatky v morfologii této stále záhadné skupiny myxozoi.

### 3 Životní cyklus myxozoi

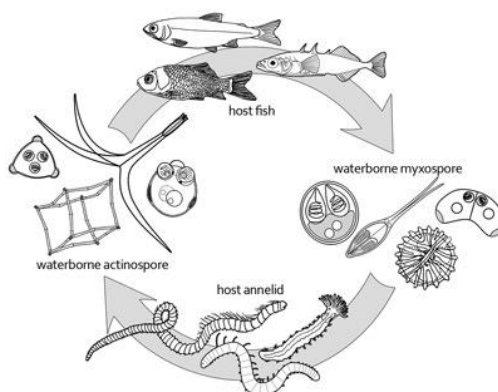
Poměrně dlouhou dobu byla Myxozoa považována za monoxenní skupinu parazitů parazitující u obratlovců. Přelom nastal při objevu definitivního hostitele (Wolf a Markiw 1984), kterým je vodní kroužkovec. U tohoto hostitele byl znám odlišný typ spory, tzv. aktinospora, jejíž morfologie je zcela odlišná (viz Kapitola 2) (Lom 1996). Kompletní životní cyklus na základě výše zmíněných zjištění byl popsán u sladkovodního druhu *Myxobolus cerebralis* (Kudo, 1933), jenž se stal hlavním modelovým organismem pro studium vývojových cyklů u myxozoi (Wolf a Markiw 1984).

Obecně se životní cyklus myxosporeí skládá ze dvou hlavních fází, jejichž názvy jsou odvozeny od typu spory, která se během nich vytváří. Mezi tyto fáze řadíme myxosporeovou a aktinosporeovou fázi (viz Obr. 3). Myxosporeová fáze probíhá nejčasteji u nižších obratlovců (ryb, obojživelníků a plazů), výjimečně u vyšších obratlovců (ptáků a savců). Počíná kontaktem aktinospory s meziphostitelem po vystřelení polárních filament z pólových váčků. Poté se samotná spora otevírá rozvolněním chlopní a unikající sporoplasma vniká přes pokožku hostitele. Uvnitř hostitele, respektive v intercelulárním prostředí, začíná sporoplasma vytvářet stádia „buňka v buňce“, kdy se sekundární buňky, vzniklé endogenním způsobem, nachází uvnitř primární buňky. Samotný vývoj spor se odehrává během sporogonické fáze, kdy primární a sekundární linie buněk z předchozí presporogonické fáze proliferují a diferencují za vzniku myxospory, která opouští svého hostitele a pokračuje tak do další „aktinosporeové“ fáze životního cyklu.

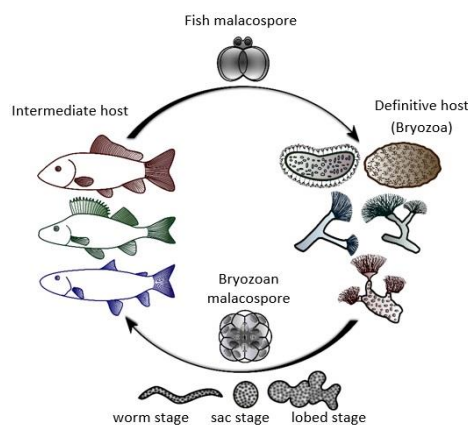
Aktinosporeová část, probíhající v definitivním hostiteli, má počáteční fázi analogickou s myxosporeovou avšak penetrace hostitele sporoplasmou probíhá průnikem mezi epiteliálními a mukózními buňkami. Presporogonická fáze zahrnuje schizogonii, kdy se sporoplasma přetváří na pseudoplasmodium obsahující velké množství vegetativních jader. Pseudoplasmodia následně migrují do cílových tkání, kde se odehrává gametogonie neboli mitotické dělení somatických buněk a meiotické dělení generativních buněk za vzniku zygot obalených somatickými buňkami. Poslední fází je fáze sporogonická, kdy periferní generativní buňky diferencují v různé typy (kapsulogenní, valvogenní, sporoplasmogenní) buněk. Na konci této fáze je produkována samostatná spora, která opouští svého hostitele a uvolňuje se do prostředí, kde napadá meziphostitele a celý cyklus se opakuje (Lom a Dyková 2006).

Kompletní životní cyklus malacosporeí (viz Obr. 4), je v současné době popsán pouze u druhu *Tetracapsuloides bryosalmonae*, původce proliferativního onemocnění ledvin (PKD),

jehož definitivním hostitelem je sladkovodní druh mechovky *Fredericella sultana*, který byl jak experimentálně, tak molekulárně ověřen (Feist a kol. 2001; Morris a Adams 2006). Počátek cyklu je obdobný jako u myxosporeí, kdy dochází k přichycení spory k epitelu rybiho hostitele prostřednictvím vystřelení polárních filament. Invaze pokožky a průchod sporoplasmy je analogický jako u infekce aktinosporou (Morris a kol. 2000; Longshaw a kol. 2002). V další fázi infekční stádia prolifерují v krevním řečišti a migrují jejím prostřednictvím do ledvin, kde se opakovaně dělí v intersticiální tkáni za vzniku stádií buňka v buňce. Tato stádia následně penetrují ledvinový kánálek, kde dochází k další proliferaci a diferenciaci ve sporu tzv. malacosporu (Morris a Adams 2008). Takto vzniklé spory jsou potom uvolňovány prostřednictvím močového traktu do prostředí, kde infikují dalšího hostitele. Definitivními hostiteli bývají zástupci různých čeledí sladkovodních mechovek (Fredericellidae, Lophopodellidae, Pectinatellidae, Plumatellidae, Cristatellidae). Rybí malacospory v coelomu definitivního hostitele dávají vznik komplexním stádiím (červovitým nebo váčkovitým), ve kterých dochází ke sporogenezi. Vzniklé spory „malacospory“ jsou uvolňovány do prostředí přes lofofór nebo jsou uvolňovány přímo uvnitř tělní dutiny definitivního hostitele (Mcgurk a kol. 2005). Takto uvolněná malacospora infikuje opět meziphostitele a celý cyklus se uzavírá.



Obr. 3: Životní cyklus myxosporeí © S. Atkinson



Obr.4: Životní cyklus malacosporéí. Převzato z Patra a kol. 2016, nepublikovaná data.

## 4 Taxonomie a nomenklatura myxozóí

V současné době Myxozoa zahrnují přibližně 2200 druhů, které jsou klasifikovány do 64 rodů a 17 čeledí (Fiala a kol. 2015b). Druhově nejpočetnějším rodem je rod *Myxobolus* s přibližně 800 popsány druhy (Liu a kol. 2013). Nomenklatura myxozóí je z velké části založena na morfologii spor, avšak s přibývajícímí molekulárními daty se ukazuje, že tato taxonomie neodpovídá výsledkům fylogenetických analýz (Fiala a Bartošová 2010).

Dříve byla Myxozoa klasifikována podle dvou odlišných typů spor do dvou tříd Myxosporea (Bütschli, 1881) a Actinosporea (Noble, 1980). Tento koncept byl zrušen (Kent a kol. 1994) na základě zjištění, že tyto dvě skupiny představují dvě fáze jednoho životního cyklu téhož druhu (Wolf a Markiw 1984) a byla ponechána pouze třída Myxosporea. Na konci 90. let 20. století došlo k vytvoření nové třídy Malacosporea pro dva rody – *Tetracapsuloides* a *Buddenbrockia*. (Canning a kol. 2000).

Klasifikace v rámci třídy Myxosporea je založena především na struktuře myxospory (tvar spory, počet chlopní a pólových váčků, počet závitů polárního filamentu, počet sporoplasem a jejich jader aj. (Lom a Arthur 1989). Přestože myxospory oplývají velkým množstvím

Kmen Cnidaria
Nezařazený podkmen Myxozoa
Třída Malacosporea
Řád Malacovalvulida
Rodina Saccosporidae: <i>Buddenbrockia</i> , <i>Tetracapsuloides</i>
Třída Myxosporea
Řád Bivalvulida
Podřád Variisporina
Rodina Sphaeromyxidae: <i>Sphaeromyxa</i>
Rodina Myxidiidae: <i>Myxidium</i> , <i>Zschokkella</i> , <i>Enteromyxum</i> , <i>Soricimyxum</i> , <i>Cystodiscus</i>
Rodina Ortholineidae: <i>Ortholinea</i> , <i>Neomyxobolus</i> , <i>Cardimyxobolus</i> , <i>Triangula</i> , <i>Kentmoseria</i>
Rodina Sinuolineidae: <i>Simuolinea</i> , <i>Myxodavistia</i> , <i>Myxoproteus</i> , <i>Bipteria</i> , <i>Paramyxoproteus</i> , <i>Neobipteria</i> , <i>Schulmania</i> , <i>Noblea</i> , <i>Latyspora</i>
Rodina Fabesporidae: <i>Fabespora</i>
Rodina Ceratomyxidae: <i>Ceratomyxa</i> , <i>Meglitschia</i> , <i>Ellipsomyxa</i> , <i>Ceratonova</i>
Rodina Sphaerosporidae: <i>Sphaerospora</i> , <i>Wardia</i> , <i>Palliatius</i>
Rodina Myxobolidae: <i>Myxobolus</i> , <i>Acauda</i> , <i>Heferellus</i> ( <i>nomen conservandum</i> )
Rodina Chloromyxidae: <i>Chloromyxum</i> , <i>Caudomyxum</i> , <i>Agarella</i>
Rodina Cocomyxidae: <i>Cocomyxia</i> , <i>Auerbachia</i> , <i>Globospora</i>
Rodina Alatosporidae: <i>Alatospora</i> , <i>Pseudoalatospora</i> , <i>Renispora</i>
Rodina Parvicapsulidae: <i>Parvicapsula</i> , <i>Neoparvicapsula</i> , <i>Gadimyxia</i>
Podřád Platysporina
Rodina Myxobolidae: <i>Myxobolus</i> , <i>Spirosuturia</i> , <i>Unicauda</i> , <i>Dicauda</i> , <i>Phlogospora</i> , <i>Laterocaudata</i> , <i>Henneguya</i> , <i>Hennegoides</i> , <i>Tetraurionema</i> , <i>Thelohanellus</i> , <i>Neothelohanelus</i> , <i>Neohenneguya</i> , <i>Trigonosporus</i>
Nejasné zařazení u Bivalvulida: <i>Sigmomyxa</i>
Řád Multivalvulida
Rodina Trilosporidae: <i>Trilospora</i> , <i>Unicapsula</i>
Rodina Kudoidae: <i>Kudoa</i>
Rodina Spinavaculidae: <i>Octospina</i>
Nejasné zařazení u Multivalvulida: <i>Trilosporoides</i>

Obr. 5: Současná nomenklatura skupiny Myxozoa (Fiala a kol. 2014).

taxonomicky informativních morfologických znaků, existují takové, které jsou společné pro několik rodů. Příkladem rodů s velmi podobnou morfologií jsou rody *Myxidium* a

*Zschokkella* nebo *Ceratomyxa*, *Leptotheca* a *Sphaerospora*. U těchto rodů byl zjištěn na základě molekulární fylogenetiky para/polyfyletický charakter.

Fylogeneze založená na 18S rDNA genu nepodporuje klasickou taxonomii myxozoi tudíž řada taxonomických změn byla provedena na základě molekulárně taxonomických výsledků. Kupříkladu došlo ke zrušení rodu *Leptotheca* (Gunter a Adlard 2010) nebo ke vzniku nových rodů a přeřazení existujících druhů do těchto rodů, např. rod *Enteromyxum* (Palenzuela a kol. 2002) nebo *Ceratonova* (Atkinson a kol. 2014). Ukázalo se, že během evoluce mohly vznikat stejné morfotypy spor několikrát na sobě nezávisle, což by vysvětlovalo existenci polyfylie a parafylie určitých rodů (Fiala a Bartošová 2010). Současná taxonomie (viz Obr. 5) se snaží hledat další znaky jako jsou např. morfologie trofických stádií, tkáňová specifita, hostitelská specifita (Fiala a kol. 2015a).

V rámci linie Malacosporea jsou kritéria pro klasifikaci obdobná jako u myxosporeí. Nicméně nomenklatura této skupiny spočívá v posuzování detailních nancí jako jsou sekvenční odlišnosti (<20%) jednotlivých stádií či existence/absence specifických stádií (Canning a kol. 2002).

## 5 Patogenita a ekonomický význam myxozoi

Přestože všechna Myxozoa jsou parazitické organismy, pouze některé druhy vyvolávají přímý imunopatologický efekt během infekce hostitele gradující v některých případech v mortalitu nakaženého jedince. Patologický efekt myxozoi je spojen s řadou faktorů, které tento účinek zvyšují a tím narůstá i míra patogenity spojená se vzrůstající proliferací parazita. Tyto faktory lze rozdělit na dvě skupiny. První skupinou jsou faktory vyvolávané samotným hostitelem (hypersenzitivita imunitního systému aj.), druhou faktory korelující se změnami environmentálních podmínek jako jsou salinita či teplota vody aj. (El-Matbouli a Hoffmann 2002; Bettge a kol. 2009a,b; Yokoyama a Shirakashi 2007). Mezi druhy myxozoi způsobující nejzávažnější ekonomické ztráty, zejména u komerčně chovaných ryb, patří *Myxobolus cerebralis*, *Ceratonova shasta*, *Tetracapsuloides bryosalmonae*, *Henneguya ictaluri*, *Enteromyxum leei*, *Kudoa thyrssites* a *Parvicapsula pseudobranchicola*. Zástupci této skupiny myxozoi jsou původci mnoha známých onemocnění ryb, které z velké části způsobují vysoký stupeň mortality v populaci rybích hostitelů. Tyto patogenní druhy myxosporeí napadají různé druhy tkání, tudíž projevy onemocnění jsou odlišné. Nakažené ryby mohou vykazovat strukturální a behaviorální abnormality jako jsou deformace těla, zkrácení čelistí, plavání v kruzích známé pod označením „whirling disease“ způsobené druhem *Myxobolus cerebralis* (Bartholomew a kol. 2002). Mezi další známé patogenní účinky patří tvorba střevních katarů u ryb ze Středozemního moře, jejichž původcem je druh *Enteromyxum leei* (Diamant a kol. 1994; Rigos a Katharios 2010). *Kudoa thyrssites*, která se často vyskytuje na farmách pro odchov lososů, způsobuje posmrtnou lyzi masa, čímž je následně kvalita ryb znehodnocena. To má za následek významné ekonomické ztráty v chovech ryb napadených tímto patogenem (Kent a Poppe 1998). Dalším příkladem u lososovitých ryb je druh *Ceratonova shasta* parazitující u ryb v pobřežních oblastech Severní Ameriky v Tichém oceánu. 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 druh *Tetracapsuloides bryosalmonae*, který působí proliferativní onemocnění ledvin u lososů chovaných v Evropě a Severní

Americ. Typické symptomy tohoto onemocnění jsou zejména markantní renomegálie či blednutí kůže (Sterud a kol. 2007; Wahli a kol. 2007). Problém výskytu těchto parazitů byl pozorován jak u volně žijících rybích populací, tak i u v zajetí chovaných (rybí farmy, akvaristika apod.). Velmi často dochází k počátku infekce introdukcí nakaženého jedince do zdravé populace či antropogenním způsobem. Právě antropogenní přenos infekčních stádií myxozoi způsobil u některých druhů (*Myxobolus cerebralis*, *Ceratomyxa shasta*) jejich kosmopolitní rozšíření (Hallet a Bartholomew 2012).



## 6 Fylogenetické vztahy myxozoi v rámci metazoi

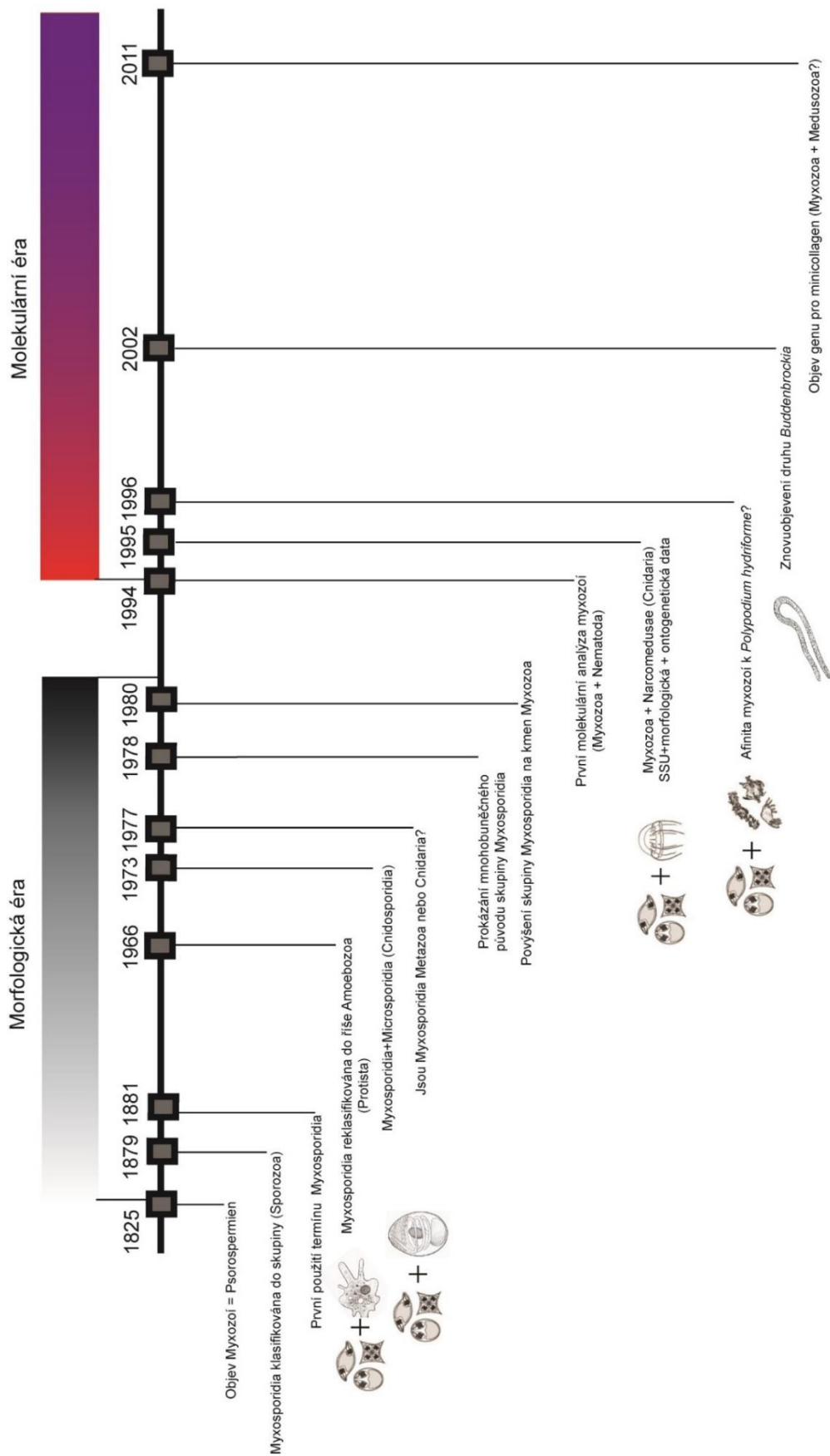
Od svého objevu prošla tato mikroskopická endoparazitická skupina žahavců různými přesuny v systému eukaryotických organismů. V prvopočátcích bylo jejich taxonomické zařazení mezi Protista založeno zejména na morfologické a později i ultrastrukturní charakteristice. Po nástupu molekulární biologie na konci 80. let minulého století došlo díky významným poznatkům v jejich fylogenezi k zásadním změnám v pochopení evolučního původu myxozoi (viz Obr. 6).

Z důvodu extrémního zjednodušení těla byla Myxozoa zpočátku považována za taxon řazený do říše prvoků (Protista) (Robin, 1853). Následně byl tento taxon vyjmut z říše prvoků a pojmenován jako samostatný taxon Myxosporidia (Bütchli, 1881). Poté na základě popisu vegetativních stádií byla Myxosporidia přesunuta do třídy Sporozoa (Leuckart, 1879), patřící do kmene Apicomplexa (Levine, 1970), jako podtřída s názvem Cnidosporidia (Doflein, 1901). Do podtřídy Cnidosporidia byly tehdy spolu se skupinou Myxosporidia rovněž zařazeny strukturně homologické organismy ze skupiny Microsporidia (Lom 1990). Na počátku 80. let minulého století byla takto definovaná nomenklatura zrušena z důvodu biologických a ultrastrukturních rozdílů mezi těmito skupinami (Levine 1980). Vyvrácením tohoto chybného zařazení se Myxozoa ocitla jako taxon *incertae sedis*, přičemž tehdejší vědecká komunita se stále přikláněla k jejich původnímu umístění mezi Protista. Přelom nastal s objevem struktur naznačující mnohobuněčný původ myxozoi, kupříkladu desmosomům podobné buněčné spoje (Grassé a Lavette 1978). Ještě předtím bylo systematické zařazení myxozoi diskutováno z pohledu podobnosti jejich pólových váčků s nematocystami larválních stádií žahavců, respektive se stádii zástupců čeledi Narcomedusae (Weill 1938; Lom a de Puytorac 1965; Shostak 1993). Přestože studie popisující mnohobuněčné struktury myxozoi poukazovaly na mnohobuněčný původ myxozoi, byla Myxozoa dále považována za Protista.

Hlavním objevem, který definitivně zamítnul stále přítomnou hypotézu příbuznosti myxozoi k protistům, bylo získání první sekvence 18S rDNA genu a její fylogenetická analýza (Smothers a kol. 1994). S nástupem molekulární biologie a vývojem sekvenačních metod byla Myxozoa podrobena četnému výzkumu z pohledu fylogenetiky. Během této éry byla Myxozoa na základě prvotních fylogenetických analýz

nejprve řazena ke skupině Bilateria, respektive k jejich bázi (sesterská pozice se skupinou Nematoda) (Smothers a kol. 1994). Po doplnění datasetu o morfologická a ontogenetická data byla Myxozoa přesunuta k žahavcům jako sesterská skupina čeledi Narcomedusae. Specifické homologické znaky myxozoi a druhu *Polypodium hydriforme* poukázaly také na možnost sesterské pozice s tímto parazitickým druhem žahavců (Siddall a kol. 1995). Jejich blízký fylogenetický vztah byl poté dáván do souvislosti s rychle se vyvíjejícími 18S rDNA geny, které mohly být příčinou vzniku sesterského vztahu díky artefaktu přitahování dlouhých větví (LBA) (Hanelt a kol. 1996; Pawlowski a kol. 1996; Schlegel a kol. 1996; Winnipenninckx a kol. 1998; Kim a kol. 1999, Zrzavý a Hypša 2003).

Se znovuobjevením *Buddenbrockia plumatellae*, červovitého organismu parazitujícího u sladkovodních mechovek (Bryozoa), se postavení myxozoi v systému metazoi částečně podařilo odhalit (Okamura a kol. 2002). Tento druh bazální skupiny myxozoi (Malacosporea) má tetraradiální symetrii, čímž bylo předchozí tvrzení afinity myxozoi k bilateriím negováno. Následná fylogenomická multigenová analýza protein-kódujících sekvencí potvrdila příbuznost myxozoi k žahavcům a určila jejich pozici jako sesterskou k linii Medusozoa (Jiménez-Guri 2007). Postavení myxozoi v rámci žahavců je stále diskutovaným tématem, kterým se zabývá nemalá část současných studií zaměřených na fylogenetickou analýzu DNA a proteinových sekvencí, mitochondriálních dat i genomových (Nesnidal a kol. 2013; Feng a kol. 2014, Fiala a kol. 2015a, Shpirer a kol. 2014). Nicméně, nedávná genomická analýza myxozoi potvrdila často zmiňovaný příbuzenský vztah myxozoi a parazitického druhu *Polypodium hydriforme* (Chang a kol. 2015).



Obr. 6: Přehled taxonomických událostí u myxozoi.

## 7 Fylogenetické vztahy v rámci myxozoi

V rámci skupiny Myxozoa jsou klasifikovány dvě třídy (Myxosporea, Malacosporea) jejichž nomenklatura je založena zejména na morfologii spor a dalších morfologicky informativních znacích. S přirůstajícím počtem sekvenovaných druhů se ukázalo, že klasifikace založená na morfologických znacích v mnoha případech neodpovídá molekulárním datům (Kent a kol. 2001). Na základě prvotních fylogenetických studií (Kent a kol. 2000, 2001) bylo prokázáno, že třída Myxosporea tvoří dvě vývojové větve korelující s ekologickými nikami hostitele. Právě podle prostředí hostitele byly tyto dvě linie myxosporeí nazvány: sladkovodní linie a mořská linie. Přibývající počet sekvencí ovšem odhalil řadu výjimek z tohoto dělení (Fiala 2006). Zdá se, že výhradním společným znakem druhů v jednotlivých hlavních větvích je druhová specifita definitivního hostitele, u kterého probíhá parazitace – zda-li se jedná o máloštětinatce (sladkovodní linie) nebo mnohoštětinatce (mořská linie). Vnitřní topologie sladkovodní a mořské větve myxosporeí odpovídá různým faktorům, které reflektují fylogenetické vztahy. Lze mezi ně zařadit kupříkladu tkáňovou specifitu (Eszterbauer 2004; Holzer a kol. 2004) nebo geografické umístění (Blaylock a kol. 2004). Kromě sladkovodní a mořské linie myxozoi byla podle analýzy 18S rDNA genu identifikována třetí linie, klastrující sestersky s předchozími liniemi (Jirků a kol. 2007).

Na základě rDNA genů se sladkovodní Myxosporea větví do pěti tzv. kládů (*Myxobolus*, *Myxidium lieberkuehni*, *Chloromyxum*, sladkovodní močový klád a „žlučový“ klád). Mořská linie myxosporeí se člení do sedmi kládů zahrnující mořské klády nazvané *Bipteria*, *Chloromyxum*, *Kudoa*, *Enteromyxum*, *Ceratonova*, *Ceratomyxa* a „žlučnickový“ klád (Fiala 2006; Whipps a kol. 2004).

V rámci mořské linie klastruje celkem sedm kládů (Fiala 2006; Whipps a kol. 2004). Počínaje bazálně se větvícím kládem *Bipteria* vytvářejícího sesterskou skupinu s klády *Ceratomyxa* a polytomicky klastrujícím mořským močovým kládem, žlučnickovým kládem a s nejvíce odvozenými klády *Kudoa* + *Enteromyxum* + *Ceratonova*. *Kudoa* klád klastruje sestersky ke kládu *Enteromyxum*, přičemž tento blízce příbuzný vztah histozoických druhů je jedním z velmi dobře podpořených větvení (Fiala a kol. 2015a; Freeman a kol. 2008). Oproti tomu, klád *Ceratonova* společně s mořským žlučnickovým a močovým kládem

představují příklad nestabilní topologie v rámci mořské linie myxosporeí. Dalším kládem, infikující příčnoústé rybovitě obratlovce (Elasmobranchii), je mořský klád *Chloromyxum* (*Chloromyxum sensu stricto* klád) klastrující sestersky ke sladkovodní linii myxosporeí (Azevedo a kol. 2009; Gleeson a Adlard 2012; Fiala 2006; Fiala a Dyková 2004).

Topologie uvnitř sladkovodní větve (viz výše) jsou podle různých typů analýz víceméně stále stejné a poměrně vysoké. Oproti tomu, v rámci mořské větve je však větvení hlavních kládů nestabilní.

Přestože sladkovodní linie myxosporeí je topologicky stabilní, jsou zde hlavním problémem alopatrické speciace druhů některých skupin naznačující intraspecifickou variabilitu či přítomnost kryptických druhů (*Zschokkella nova*, *Sphaeromyxa hellandi*). Dílčím problémem je zároveň přítomnost skupin obsahující blízce příbuzné druhy z odlišných rodů, kupříkladu druhy *Myxidium lieberkuehni*, *Sphaerospora oncorhynchi* a *Chloromyxum legeri* (Fiala 2006). Tento jev je nejspíše výsledkem nezávislé evoluce stejných morfotypů myxospor, které jsou u myxozoi častým artefaktem (Fiala a Bartošová 2010).

V rámci mořské linie se ukázalo, že problematické větvení jednotlivých kládů je zapříčiněno jednotlivými sekvencemi 18S rDNA, kdy tento gen je u mořských zástupců kratší než u sladkovodních (viz Kapitola 8). Dále aberantní chování těchto sekvencí s tendencí tvorby artefaktů LBA a polytomického charakteru větvení. Veškeré tyto anomálie snižují podporu větvení jednotlivých kládů a tím znesnadňují určení fylogenetických vztahů těchto podskupin (Fiala 2006). Nicméně podle aktuálně redefinované fylogeneze mořské linie myxosporeí se zdá, že navzdory molekulárním markerům a morfologii spor je lokalizace sporulace daných druhů přesnějším kritériem pro odhalování fylogenetických vztahů (Fiala a kol. 2015a).

Přesto geny pro ribozomální DNA nepředstavují ideální marker pro fylogenezi myxosporeí z důvodu divergence jednotlivých sekvencí, které korelují s vysokou evoluční rychlostí těchto genů. Provedené kombinované analýzy využívající jako hlavní markery 18S a 28S rDNA (Bartošová a kol. 2009) či jaderný gen pro elongační faktor 2 (EF-2) (Fiala a Bartošová 2010) nepřinesly zásadní řešení problematiky fylogeneze myxosporeí (viz Kapitola 8).

Třída Malacosporea představující evolučně bazální linii myxozoi, ze které pravděpodobně diverzifikací vznikla předchozí myxosporeová linie (Anderson a kol. 1999), je z hlediska fylogeneze málo prostudovanou skupinou. Jedním z důvodů je malý počet popsanych druhů, které podle prvotních fylogenetických studií klastrují v rámci dvou podskupin (*Tetracapsuloides*, *Buddenbrockia*) přičemž v rámci těchto podskupin byly definovány částečné vnitřní fylogenetické vztahy (Tops a kol. 2005; Grabner a El-Matbouli 2010). Nicméně topologie těchto dvou podskupin je založená na stejných kritériích jako u myxosporeí (komplexní stádia, hostitelská specifita), avšak díky velké druhové diverzitě jak definitivních (mechovky), tak intermediálních hostitelů (ryby) a jejich distribuci je zde předpokládána vysoká diverzita (Canning a Okamura 2004; Grabner a El-Matbouli 2010). Nedávná analýza velkého množství mezihostitelů naznačila skrytou biodiverzitu malacosporeí u cypriniformních a perciformních druhů ryb. Zároveň podle fylogenetických analýz byly identifikovány v rámci těchto hostitelů tři rody s pěti novými druhy zástupců *Buddenbrockia* a *Tetracapsuloides* (Bartošová-Sojková a kol. 2014; Hartikainen a kol. 2014).

## 8 Fylogenetické markery, problematika a jejich využití u myxozoi

S nástupem molekulární biologie a s tím souvisejícím rozvojem molekulární fylogenetiky započalo odhalování fylogenetických vztahů napříč různými skupinami eukaryot. Jako prvotní univerzální marker byl využit gen pro malou ribozomální podjednotku (18S rDNA). Výjimkou nebyla ani Myxozoa, jejichž první získaná sekvence pro tento gen byla využita jako fylogenetický marker pro určení jejich pozice v rámci eukaryotických organismů (Smothers a kol. 1994).

S přibývajícím počtem sekvenovaných druhů myxozoi byly nastíněny první mezidruhové vztahy v rámci myxosporeí (Smothers a kol. 1994; Siddall a kol. 1995; Schlegel a kol. 1996). 18S rDNA gen se ukázal jako fylogeneticky informativní vzhledem k jeho charakteru a to přítomností konzervativních a variabilních oblastí, které umožňují odhalovat příbuzenské vztahy jak u blízce příbuzných druhů, tak i u velmi vzdálených. S postupným nárůstem molekulárních dat se však ukázalo, že fylogeneze na základě 18S rDNA neodráží morfologicky definované taxonomické vztahy (Kent a kol. 2001), přičemž bylo zároveň odhaleno velké množství para/polyfyletických rodů (Fiala 2006).

Dalším úskalím 18S rDNA je jeho výrazně odlišná délka u druhů klastrujících v rámci sladkovodní linie a u druhů klastrujících v rámci mořské linie myxosporeí. U mořské linie je tento gen kratší, přibližně 1700 nt dlouhý, oproti sladkovodní linii s průměrnou délkou kolem 2100 nt. Extrémní délky dosahují sekvence 18S rDNA u linie zvané *Sphaerospora sensu stricto*. Díky vysokému počtu inzertů se mnohonásobně zvětšuje délka genu až na 3000 nt a i více (Holzer a kol. 2007; Jirků a kol. 2007). Tato Myxosporea mají jedny z nejdelších 18S rDNA v rámci eukaryotické říše.

Dalším markerem ze skupiny rDNA genů je gen pro velkou ribozomální podjednotku (28S rDNA). Tento gen byl u myxozoi poprvé použit pro objasnění fylogenetických vztahů v rámci skupiny Multivalvulida (Whipps a kol. 2004a). Následné využití tohoto markeru spočívalo v tvorbě kombinovaných analýz s předchozím již používaným 18S rDNA genem (Whipps a kol. 2004a; Bartošová a kol. 2009, 2013). Ukázalo se, že fylogenetická informativnost 28S rDNA je větší než u 18S rDNA (Bartošová a kol. 2009), avšak počet dostupných 28S rDNA sekvencí je nesrovnatelně nižší oproti univerzálně využívanému 18S rDNA markeru.

Zejména neshoda fylogenetických analýz, založených na ribosomálních DNA datech, s taxonomií byla hnacím motorem pro získání sekvencí z dalších fylogeneticky vhodných markerů. Jedním z nich je gen pro heat shock protein 70. Na základě tohoto proteinu se topologie příbuzenských vztahů mezi jednotlivými druhy shodovala s 18S rDNA analýzami (Whipps a Kent 2006). Dalším genem, jehož fylogenetický patern vykazoval homologii s provedenými rDNA studiemi, je elongační faktor 2 (EF-2) (Fiala a Bartošová 2010). Ačkoli tento jaderný marker fylogeneticky odpovídal rDNA fylogenezi myxozoi, jeho informativnost je nižší než u 28S i 18S rDNA (Fiala a kol. 2015a).

Mezi další používané fylogenetické markery patří tzv. mezerníky (internal transcribed spacers; ITSs). Od těchto markerů bylo očekáváno vyřešení vztahů blízce příbuzných druhů z důvodu vyšší evoluční rychlosti než u 18S rDNA. Nicméně podle fylogeografických studií (Whipps a Kent 2006; Henderson a Okamura 2004) byla zjištěna rozsáhlá intragenomická variabilita, tudíž možnost posouzení vztahů u blízce příbuzných druhů se ukázala jako omezená (Henderson a Okamura 2004). Navzdory popsané problematice ITS sekvencí se tyto markery podařilo úspěšně využít, a to pro odhalení kryptických druhů myxosporeí u obojživelníků (Hartigan a kol. 2011).



## 9 Taxonomically restricted genes u žahavců a myxozoi

Prvotní hypotéza afinity myxozoi k žahavcům, charakterizovaná na základě morfoloicky homologních struktur nematocyst a pólových váčků (Weill 1938; Lom a de Puytorac 1965; Shostak 1993) poukázala na podobnost molekulární výbavy těchto organel. Nezvratným důkazem se stal objev specifického genu pro minicolagen u zástupce *Tetracapsuloides bryosalmonae*, jehož přítomnost je omezena právě pouze na nematocysty žahavců (Holland a kol. 2011). Tento gen je součástí velké skupiny genů tzv. Taxonomically restricted genes (TRGs). Tyto taxonomicky „omezené“ geny, zodpovědné za unifikaci znaků určitých skupin, byly charakterizovány kromě žahavců i u ostatních organismů včetně bakterií (Wilson a kol. 2005; Wissler a kol. 2013). Diverzita a funkce těchto specifických genů byly velmi dobře charakterizovány u nematocyst žahavců, které zároveň představují nezbytný taxonomický znak pro klasifikaci žahavců (Mariscal 1974, Weill 1934a, Weill 1934b). Distribuce těchto unifikovaných organel je v rámci žahavců zcela nerovnoměrná, přičemž jejich markantní diverzita byla zaznamenána zejména u zástupců skupiny Hydrozoa (David a kol. 2008). Jednotlivé druhy se tím staly modelovými organismy pro studium exprese a funkce TRGs účastnící se morfogeneze nematocyst. Během diferenciace nematocyst bylo identifikováno 410 molekulárních komponent z nichž nemalou část tvoří 22 genově specifických proteinů. Mezi tyto specifické bílkoviny podílející se na vývoji a funkci nematocysty lze zařadit proteiny s trojitými kolagenovými šroubovicemi, tzv. minicolageny.

Minicolageny zahrnují velkou část částečně konzervovaných genů, které jsou exprimovány během rané fáze diferenciace nematocysty. Strukturně se tyto geny skládají z centrálních částí opakujících se kolagenových úseků, které zasahují do velikostně variabilních polyprolinových oblastí zakončené konzervovanými cysteinovými doménami (CRD) viz. Obr. 8 (Özbek a kol. 2002a). Během zrání nematocysty se tyto proteiny nachází v rozpuštěném stavu a jsou sekretovány ve formě monomerů (Engel a kol. 2001). V konečné fázi zrání jsou minicolageny chemicky modifikovány a ukotveny ve vnitřní straně stěny ve formě vysoce kompaktní molekulární struktury (Özbek a kol. 2002b). Nicméně některé homology minicolagenů (NCol-15) nejsou lokalizovány ve stěně nematocysty nýbrž v jejím vystřelovacím vlákně (Adamczyk a kol. 2008). Na základě jednotlivých subtypů minicolagenů byla pozorována korelace mezi lokalizací minicolagenů a typem

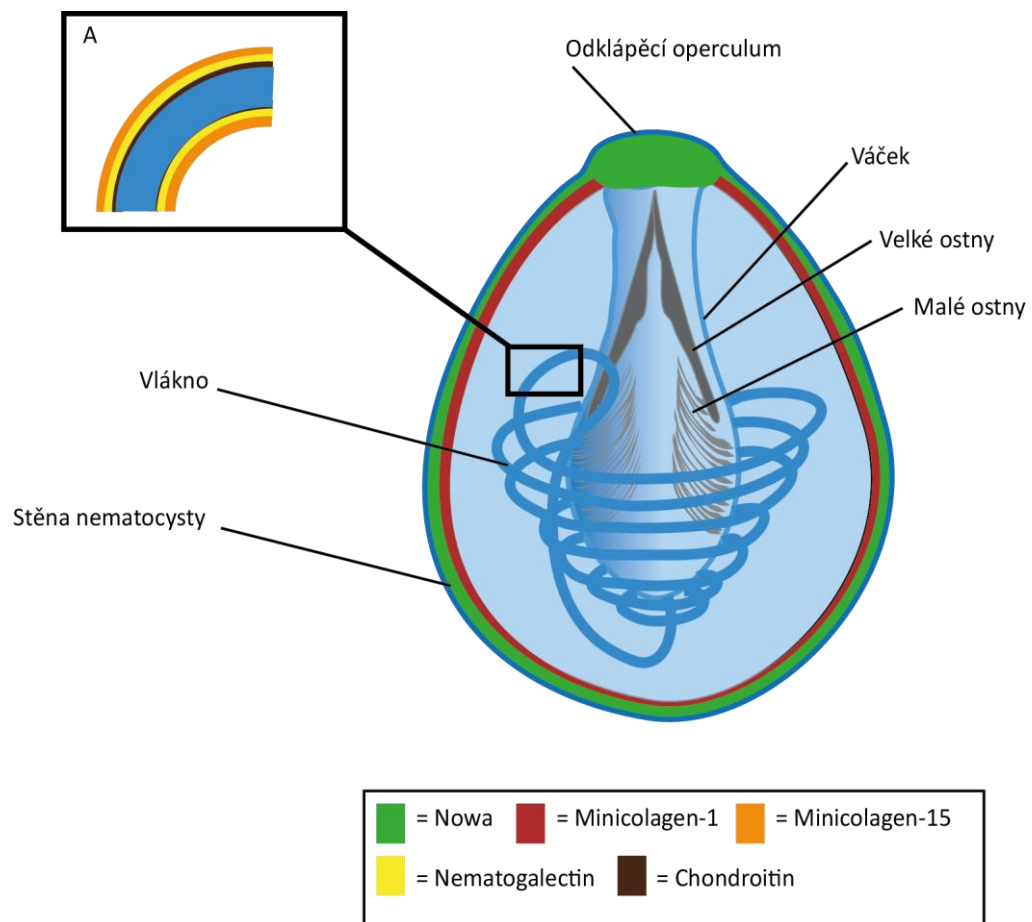
nematocysty včetně její struktury naznačující možnost důvodu jejich diverzity (David a kol. 2008; Adamczyk a kol. 2008). Z hlediska funkce se tyto geny podílejí na odolávání nematocysty osmotickému tlaku společně se specifickým antigenem NOWA (Özbek a kol. 2002b), nicméně jejich další funkce jsou zatím neznámé.

Další specifickou komponentou exprimovanou během časně fáze diferenciaci nematocysty je antigen NOWA (nematocyst outer wall antigen). Z hlediska modulární struktury je tento glykoprotein částečně homologní s minicolageny v oblasti CRD, avšak jeho N-terminální oblast obaluje glykoproteinovou doménu. V rámci diferenciaci nematocysty je tento protein izomerizován a ukotven na vnější straně stěny nematocysty pomocí disulfidických můstků spojující tento protein s minicolageny. Funkce glykoproteinu NOWA je asociována s minicolageny v odolávání tlaku během vystřelení tubulárního vlákna při aktivaci nematocysty (Engel a kol. 2002).

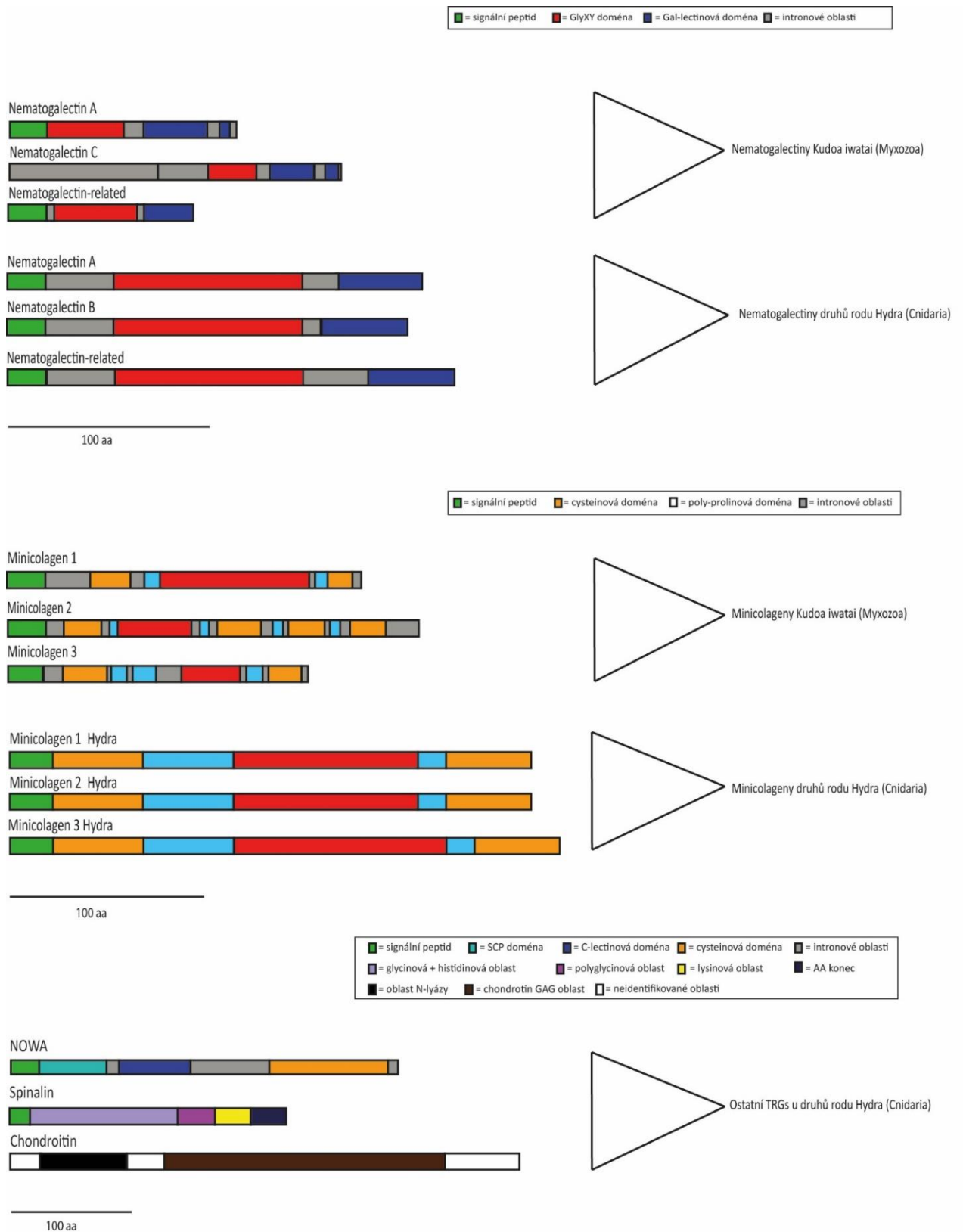
Nematocysty žahavců disponují dalšími třemi nezbytnými proteiny, kterými jsou spinalin, chondroitin a nematogalectiny, jejichž lokalizace a doménová struktura jsou zcela unikátní. Strukturální protein spinalin nacházející se na povrchu vystřelovacího vlákna má společně s dalšími proteiny specifickou funkci, která spočívá ve vytváření různých počtů a tvarů trnů na tomto invertovaném vláknu (Koch a kol. 1998). Oproti tomu spinalin, lokalizovaný v operculu nematocysty, je hlavní komponentou tvorby této struktury u nematocysty (Koch a kol. 1998; Hellstern a kol. 2006). Dalším unikátním proteinem zajišťující stabilizaci a tvorbu 3D struktury nematocysty je protein chondroitin. Ekvivalent chondroitinu je znám u živočichů včetně člověka, kde je součástí pojivových tkání a mezibuněčné hmoty chrupavek jako jeho síranová forma (chondroitin sulfát) (Monfort a kol. 2007, 2008). Tato forma chondroitinu, která je řazena mezi tzv. proteoglykany, má u žahavců nejasnou funkci, která zřejmě spočívá ve stabilizaci prostředí pro tvorbu komponent nematocysty nebo mohou sloužit jako samotné komponenty (Yamada a kol. 2007). Nicméně běžnou formou tohoto proteinu u nematocyst žahavců je samotný nesulfovaný chondroitin, který se účastní společně s nematogalectiny (viz Kapitola 10) stabilizace a iniciace tvorby tubulární struktury (ejektilní vlákno) nematocysty. Oproti nematogalectinům je lokalizován na vnější straně vlákna (Adamczyk a kol. 2010).

Výše zmíněné specifické komponenty nematocysty (viz Obr. 7) jsou stále považovány za unikátní proteiny, jejichž přítomnost je omezena pouze na žahavce.

Identifikace těchto proteinů u myxozoi přinesla novou hypotézu evoluce těchto genů v rámci žahavců. Myxozoa disponují redukovaným počtem některých z těchto proteinů (Nematogalectin A, C, related) přičemž zároveň zde byla pozorována i absence některých proteinů (NOWA, spinalin, chondroitin), což by vysvětlovalo možnou korelaci mezi simplifikací tělních struktur (pólový váček) a TRGs (Shpirer a kol. 2014).



Obr. 7: Schéma struktury TRG genů u žahavců a myxozoi. Převzato z: Adamczyk a kol. 2008; Engel a kol. 2002; Hwang a kol. 2010; Koch a kol. 1998; Lim a kol. 2014; Pokidysheva a kol. 2004; podle Shpirer a kol. 2014.



Obr. 8: Schéma struktury TRG genů u žahavců a myxozoí. Převzato z: Koch a kol. 1998; Monfort a kol. 2007, 2008; Özbek a kol. 2002a; Özbek a kol. 2002b; podle Shpirer a kol. 2014.

## 10 Nematogalectiny jako TRGs u žahavců a myxozoi

Formování nematocysty se účastní specifické geny jejichž ortology byly u ostatních metazoi zpočátku vyloučené (Hwang a kol. 2007; Milde a kol. 2009). Tyto geny byly nazvány nematogalectiny z důvodu jejich unikátní genetické struktury (viz níže) a přítomností v nematocystách žahavců. Studium transkripce těchto genů bylo identifikováno několik isoform, nicméně pouze některé z nich dávají za vznik čtyřem známým typům nematogalectinů (nematogalectin-A, nematogalectin-B, nematogalectin-C, nematogalectin-related). Vznik těchto isoform u žahavců je následkem alternativního splicingu avšak správné pořadí jednotlivých exonů vytváří funkčně aktivní typ nematogalectinu. Během diferenciac nematocysty jsou tyto geny asociovány s dalšími specifickými geny (minicolagen-15, chondroitin sulfát) účastnící se tvorby tubulární stěny vystřelovaného vlákna a vlákna jako takového. Exprese těchto genů se během diferenciac liší jak v konkrétním typu nematocysty, tak i mezi ostatními typy. (Hwang a kol. 2010).

Délka a struktura jednotlivých typů nematogalectinů napříč žahavci je víceméně konstantní (cca. 295 aminokyselin). Obecná struktura těchto proteinů se skládá z N-terminální části proteinu kódující signální peptid sloužící k translaci na endoplazmatickém reticul. Po této části následuje 30 glycinů, které jsou z obou stran obklopeny dvěma hydrofobními aminokyselinami (GlyXY). Stejně jako minicolageny mají ve své sekundární konfiguraci trojitě šroubovitě struktury kolagenu, které je společně řadí do kolagenové skupiny genů. (Engel a kol. 2001; Özbek a kol. 2002). C-terminální oblast proteinu obsahuje galaktózu-vázající lectinovou doménu, která je zakončena sekvencemi argininu a lysinu. Jednotlivé části proteinu jsou zároveň kódovány jedním exonem, tudíž nematogalectiny představují tzv. „single copy genes“ (Hwang a kol. 2010).

Co se týče lokalizace těchto proteinů v rámci nematocyst, prvním exprimovaným typem je nematogalectin-B, jenž je umístěn na proximální části vlákna. Oproti tomu později exprimovaný nematogalectin-A se nachází v distální oblasti vlákna s čímž souvisí morfologická různorodost vláken napříč žahavci. Zároveň jednotlivé typy nematogalectinů nejsou vzájemně exprimovány, kupříkladu nematogalectin A a B, což potvrzuje důsledek alternativního splicingu (Hwang a kol. 2010). Společně s výše zmíněnými typy nematogalectinů je během diferenciac nematocysty exprimován poslední typ tzv. nematogalectin-related, jehož struktura je stejná avšak jeho funkce a lokalizace je u

žahavců prozatím neznámá (Grasso a kol. 2008).

Během evoluce žahavců došlo ke ztrátám některých typů nematogalectinů pomocí četných tandémových duplikací. Touto ztrátou oplývá kupříkladu skupina Anthozoa, která během diverzifikace linie meduzozoi iverzibilně ztratila nematogalectin A. U ostatních skupin žahavců je tento gen přítomen společně s dalšími typy, které spolu s ostatními proteiny přispěly k velké diverzitě nematocyst u žahavců (Hwang a kol. 2010).

Objevením těchto genů u myxozoi se otevřela otázka struktury a funkce nematogalectinů v pólových váčcích. Zjednodušení struktury nematocysty v pólový váček s sebou pravděpodobně neslo i ztrátu některých typů nematogalectinů, kupříkladu nematogalectin-B (Shpirer a kol. 2014). Ztráta tohoto genu u myxozoi pravděpodobně koreluje s absencí trnů na pólovém filamentu (Cannon a Wagner 2003). Myxozoa oproti ostatním žahavcům disponují pouze třemi typy nematogalectinů (Ngal-A, Ngal-C, Ngal-related) přičemž exprese a funkce těchto proteinů u myxozoi jsou stále neobjasněny (Shpirer a kol. 2014). Z fylogenetického hlediska vytváří nematogalectiny celkem tři klády korelující s daným typem, nicméně jejich využití pro fylogenezi žahavců či myxozoi zatím nebylo provedeno (Hwang a kol. 2010). Nedávná publikace identifikující nematogalectiny u myxozoi využila tento gen ve fylogenezi myxozoi v rámci žahavců ovšem pouze jako metodu pro identifikaci daného typu nematogalectinu (Shpirer a kol. 2014). Na základě této publikace jsme se rozhodli využít tento informativní marker, který naznačuje progresivní pohled do fylogeneze myxozoi jak v rámci žahavců tak i samotné skupiny (viz Kapitola 12 Výsledky).

## **10 Cíle práce**

Následující pasáž o rozsahu jedné strany obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

## **11 Materiál a metody**

Následující pasáž o rozsahu třech stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.



## **12 Výsledky**

Následující pasáž o rozsahu deseti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

## **13 Diskuze**

Následující pasáž o rozsahu pěti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

## **14 Závěr**

Následující pasáž o rozsahu dvou stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

## 15 Zdroje

Adamczyk, P., Meier, S., Gross, T., Hobmayer, B., Grzesiek, S., Bach-Inger, H.P., Holstein, T.W., Özbek, S. (2008). Minicollagen-15, a novel minicollagen isolated from Hydra, forms tubule structures in nematocysts. *Journal of Molecular Biology* 376, pp. 1008–1020.

Adamczyk, P., Zenkert, C., Prakash, G., Balasubramanian, P.G., Yamada, S., Murakoshi, S., Sugahara, K., Hwang, J.G., Gojobori, T., Holstein, T.W., Özbek, S. (2010). A Non-sulfated Chondroitin Stabilizes Membrane Tubulation in Cnidarian Organelles. *The Journal of Biological Chemistry* 285, pp. 25613–25623.

Anderson, C.L., Canning, E.U., Okamura, B. (1999). Molecular data implicate bryozoans as hosts for PKX (Phylum Myxozoa) and identify a clade of bryozoan parasites within the Myxozoa. *Parasitology* 119, pp. 555–561.

Atkinson, S.D., Foott, J.S., Bartholomew, J. (2014). Erection of *Ceratonova* n. gen. (Myxosporae: Ceratomyxidae) to encompass freshwater species *C. gasterostea* n. sp. from threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and *C. shasta* n. comb. from salmonid fishes. *Journal of Parasitology* 100, pp. 640–645.

Azevedo, C., Casal, G., Garcia, P., Matos, P., Teles-Grilo, L., Matos, E. (2009). Ultrastructural and phylogenetic data of *Chloromyxum riorajum* sp. nov. (Myxozoa), a parasite of the stingray *Rioraja agassizii* in Southern Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms* 85, pp. 41–51.

Bartošová, P., Fiala, I., Hypša, V. (2009). Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporeans (Myxozoa: Myxosporae) and provide effective tool for their molecular phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53, pp. 81–93.

Bartošová, P., Fiala, I., Jirků, M., Cinková, M., Caffara, M., Fioravanti, M.L., Atkinson, S.D., Bartholomew, J., Holzer, A.S. (2013). Sphaerospora sensu stricto: taxonomy, diversity and evolution of a unique lineage of myxosporeans (Myxozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68, pp. 93–105.

Bartošová, P., Freeman, M.A., Yokoyama, H., Caffara, M., Fiala, I. (2011). Phylogenetic position of *Sphaerospora testicularis* and *Latyspora scomberomori* n. gen. n. sp. (Myxozoa) within the marine urinary clade. *Parasitology* 138, pp. 381–393.

Bartošová-Sojtková, P., Hrabcová, M., Pecková, H., Patra, S., Kodádková, A., Jurajda, P., Tým, T., Holzer, A.S. (2014). Hidden diversity and evolutionary trends in malacosporean parasites (Cnidaria: Myxozoa) identified using molecular phylogenetics. *International Journal for Parasitology* 44, pp. 565–577.

Bettge, K., Segner, H., Burki, R., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T. (2009a). Proliferative kidney disease (PKD) of rainbow trout: temperature and time-related changes of *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in the kidney. *Parasitology* 136, pp. 615–625.

Bettge, K., Wahli, T., Segner, H., Schmidt-Posthaus, H. (2009b). Proliferative kidney disease in rainbow trout: time- and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Diseases of Aquatic Organisms* 83, pp. 67–76.

- Blaylock, R.B., Bullard, S.A., Whipps, C.M. (2004). *Kudoa hypoepicardialis* n. sp. (Myxozoa: Kudoidae) and associated lesions from the heart of seven perciform fishes in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Parasitology* 90, pp. 584–593.
- Canning, E.U., Curry, A., Feist, S.W., Longshaw, M., Okamura, B. (2000). A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47, pp. 456–468.
- Canning, E.U., Okamura, B. (2004). Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Advances in Parasitology* 56, pp. 43–131.
- Cannon, Q., Wagner, E. (2003). Comparison of discharge mechanisms of cnidarian cnidae and myxozoan polar capsules. *Reviews in Fisheries Science* 11, pp. 185–219.
- Carriero, M.M., Adriano, E.A., Silva, M.R., Ceccarelli, P.S., Maia, A.A.M. (2013). Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *PLoS One* 8, e73713.
- Cech, G., Molnár, K., Székely, C. (2012). Molecular genetic studies on morphologically indistinguishable *Myxobolus* spp. infecting cyprinid fishes, with the description of three new species, *M. alvarezae* sp. nov., *M. sitjae* sp. nov. and *M. eirasianus* sp. nov. *Acta Parasitologica* 57, pp. 354–366.
- David, C.N., Özbek, S., Adamczyk, P., Meier, S., Pauly, B., Chapman, J., Hwang, J.S., Gojobori, T., Holstein, T.W. (2008). Evolution of complex structures: minicollagens shape the cnidarian nematocyst. *Trends in Genetics* 28, pp. 431–438.
- El-Matbouli, M., Hoffmann, R.W. (2002). Influence of water quality on the outbreak of proliferative kidney disease—field studies and exposure experiments. *Journal of Fish Diseases* 25, pp. 459–467.
- Engel, U., Özbek, S., Engel, R., Petri, B., Lottspeich, F., Holstein, T.W. (2002). NOWA, a novel protein with minicollagen Cys-rich domains involved in nematocyst formation in *Hydra*. *Journal of Cell Science* 115, pp. 3923–3934.
- Engel, U., Pertz, O., Fauser, Ch., Engel, J., David, C.N., Holstein, T.W. (2001). A switch in disulfide linkage during minicollagen assembly in *Hydra* nematocysts. *The EMBO Journal* 20, pp. 3063–3073.
- Eszterbauer, E. (2004). Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporidia) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity. *Diseases of Aquatic Organisms* 58, pp. 35–40.
- 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.
- Feist, S.W., Longshaw, M., Canning, E.U., Okamura, B. (2001). Induction of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* via the bryozoan *Fredericella sultana* infected with *Tetracapsula bryosalmonae*. *Diseases of Aquatic Organisms* 45, pp. 61–68.

- 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. 1–13.
- Fiala I., Bartošová-Sojtková, P., Whipps, Ch.M. (2015b). Chapter 5. Myxozoan Evolution, Ecology and Development (ed. Okamura, B., Bartholomew, J., Gruhl, A.), pp. 85–110, Springer International Publishing, Switzerland.
- 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 gene sequences. *Folia Parasitologica* 51, pp. 211–214.
- Fiala, I., Hlavničková, M., Kodádková, A., Freeman, M.A., Bartošová-Sojtková, P., Atkinson, S.D. (2015a). Evolutionary origin of *Ceratomyxa shasta* and phylogeny of the marine myxosporean lineage. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 86, pp. 75–89.
- Freeman, M.A., Yokoyama, H., Ogawa, K. (2008). Description and phylogeny of *Ceratomyxa anko* sp. n. and *Zschokkella lophii* sp. n. from the Japanese anglerfish, *Lophius litulon* (Jordan). *Journal of Fish Diseases* 31, pp. 921–930.
- Gleeson, R., Adlard, R.D. (2012). Phylogenetic relationships amongst *Chloromyxum* Mingazzini, 1890 (Myxozoa: Myxosporea), and the description of six novel species from Australian elasmobranchs. *Parasitology International* 61, pp. 267–274.
- Grabner, D.S., El-Matbouli, M. (2010). Experimental transmission of malacosporean parasites from bryozoans to common carp (*Cyprinus carpio*) and minnow (*Phoxinus phoxinus*). *Parasitology* 137, pp. 629–639.
- Grasso, L.C., Maindonald, J., Rudd, S., Hayward, D.C., Saint, R., Miller, D.J., Ball, E.E. (2008). Microarray analysis identifies candidate genes for key roles in coral development. *BMC Genomics* 9, pp. 1–18.
- Grell, K. G. (1973). *Protozoology*. Springer-Verlag. New York.
- 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, pp. 81–104.
- Hallett, S.L., Bartholomew, J. (2012). Chapter 8. *Myxobolus cerebralis* and *Ceratomyxa shasta* In book: *Fish parasites: Pathobiology and Protection* (ed. Woo, P.T.K., Buchmann, K.) pp.141–172. CAB International, Wallingford.
- 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.
- Hartigan, A., Fiala, I., Dyková, 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, e18871.

Hartikainen, H., Hrubl, A., Okamura, B. (2014). Diversification and repeated morphological transitions in endoparasitic cnidarians (Myxozoa: Malacosporea). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 76, pp. 261–269.

Hellstern, S., Stetefeld, J., Fauser, C., Lustig, A., Engel, J., Holstein, T.W., Özbek, S. (2006). Structure/function analysis of spinalin, a spine protein of *Hydra* nematocysts. *FEBS Journal* 273, pp. 3230–3237.

Henderson, M., Okamura, B. (2004). The phylogeography of salmonid proliferative kidney disease in Europe and North America. *Proceedings of the Royal Society; Biological Sciences* 271, pp. 1729–1736.

Holland, J.W., Okamura, B., Hartikainen, H., Secombes, C.J. (2011). A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proceedings of the Royal Society; Biological Sciences* 278, pp. 546–553.

Holzer, A.S., Sommerville, C., 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, pp. 1099–1111.

Hwang, J.S., Ohyanagi, H., Hayakawa, S., Osato, N., Nishimiya-Fujisawa, Ch., Ikeo, K., David, C.N., Fujisawa, T., Gojobori, T. (2007). The evolutionary emergence of cell type-specific genes inferred from the gene expression analysis of *Hydra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 14735–14740.

Hwang, J.S., Takaku, Y., Momose, T., Adamczyk, P., Özbek, S., Ikeo, K., Khalturin, K., Hemmrich, G., Bosch, T.C., Holstein, T.W., David, C.N., Gojobori, T. (2010). Nematogalectin, a nematocyst protein with GlyXY and galectin domains, demonstrates nematocyte-specific alternative splicing in *Hydra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, pp. 18539–18544.

Jirků, M., Fiala, I., Modrý, D. (2007). Tracing the genus *Sphaerospora*: rediscovery, redescription and phylogeny of the *Sphaerospora ranae* (Morelle, 1929) n. comb. (Myxosporea, Sphaerosporidae), with emendation of the genus *Sphaerospora*. *Parasitology* 134, pp. 1727–1739.

\*Jurine, L.L. (1825). *Histoire des poissons du Lac Léman*. *Memoires de la Société de physique et d'histoire naturelle de Genève* 3.

Katharios, P., Rigos, P., Divanach, P. (2011). *Enteromyxum leei* (Myxozoa), a Lethal Intruder of Tropical Pet Fish: First Case in Humphead Wrasse, *Cheilinus undulatus* (Rüppell, 1835). *Journal of Exotic Pet Medicine* 20, pp. 138–143.

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.

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., Hallet, S.L., Lester, R.J.G.,

- Longshaw, M., Palenzuela, 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., Hervio, D.M., Docker, M.F., Devlin, R.H. (1996). Taxonomy studies and diagnostic tests for myxosporean and microsporidian pathogens of salmonid fishes utilising ribosomal DNA sequence. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43, pp. 98–99.
- Kent, M.L., Khattra, J., Hedrick, R.P., Devlin, R.H. (2000). *Tetracapsula renicola* n. sp. (Myxozoa: Saccosporidae); the PKX myxozoan – the cause of proliferative kidney disease of salmonid fishes. *Journal of Parasitology* 86, pp. 103–111.
- Kent, M.L., Margolis, L., Corliss, J.O. (1994). The demise of a class of protists-taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protist phylum Myxozoa Grassé, 1970. *Canadian Journal of Zoology* 72, pp. 932–937.
- Kim, J., Kim, W., Cunningham, C.W. (1999). A new perspective on lower metazoan relationships from 18S and DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 16, pp. 423–427.
- Kodádková, A., Bartošová-Sojková, P., Holzer, A.S., Fiala, I. (2015). *Bipteria vetusta* n. sp. – an old parasite in an old host: tracing the origin of myxosporean parasitism in vertebrates *International Journal for Parasitology* 45, pp. 269–276.
- Kodádková, A., Dyková, I., Tým, T., Ditrich, O., Fiala, I. (2014). Myxozoa in high Arctic: Survey on the central part of Svalbard archipelago. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 3, pp. 41–56.
- Koch, A.W., Holstein, T.W., Mala, C., Kurz, E., Engel, J., David, C.N. (1998). Spinalin, a new glycine- and histidine-rich protein in spines of Hydra nematocysts. *Journal of Cell Science* 111, pp. 1545–1554.
- Kristmundsson, A., Freeman, M.A. (2013). Sphaeromyxids form part of a diverse group of myxosporeans infecting the hepatic biliary systems of a wide range of host organisms. *Parasites & Vectors* 6, p. 51.
- Kudo, R. (1933). A taxonomic consideration of Myxosporidia. *Transactions of the American Microscopical Society* 52, pp. 195–216.
- Li, Y-C., Sato, H. (2014). Two novel myxosporean species (Myxosporea: Bivalvulida), *Myxobolus marumotoi* n. sp. and *Cardimyxobolus japonensis* n. sp., from the dark sleeper, *Odontobutis obscura*, in Japan. *Parasitol Research* 113, pp. 1371–1381.
- Lom, J. (1990). Phylum Myxozoa. In *Handbook of Protozoa* (ed. Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M. and Chapman, D. J.), pp. 36–52. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Lom, J. (1996). Prvoci kmene Myxozoa novou skupinou vícebuněčných parazitů. *Vesmír* 75, pp. 146.
- Lom, J., Arthur, J.R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases* 12, pp. 151–156.
- Lom, J., de Puytorac, P. (1965). Studies on the myxosporidian ultrastructure and polar capsule development. *Protistologica* 1, pp. 53–65.



- Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica* 53, pp. 1–36.
- Longshaw, M., Le Deuff, R.M., Harris, A.F., Feist, S.W. (2002). Development of proliferative kidney disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following short-term exposure to *Tetracapsula bryosalmonae* infected bryozoans. *Journal of Fish Diseases* 25, pp. 443–449.
- Lopez-Giraldez, F., Townsend, J.P. (2011). PhyDesign: an online application for 1061 profiling phylogenetic informativeness. *BMC Evolutionary Biology* 11, p. 4.
- Mariscal, R.N. (1974). *Experimental marine biology*. Academic Press, New York.
- Mcgurk, C., Morris, D.J., Bron, J.E., Adams, A. (2005). The morphology of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) spores released from *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Journal of Fish Diseases* 28, pp. 307–312.
- Milde, S., Hemmrich, G., Anton-Erxleben, F., Khalturin, K., Wittlieb, J., Bosch, T.G.G. (2009). Characterization of taxonomically restricted genes in a phylum-restricted cell type. *Genome Biology* 10, pp. R8.
- Monfort, J., Pelletier, J.P., Garcia-Giralt, N., Martel-Pelletier, J. (2007). Biochemical basis of the effect of chondroitin sulfate on osteoarthritis articular tissues. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67, pp. 735–740.
- Morris, D.J., Adams, A. (2006). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea), the causative organism of salmonid proliferative kidney disease, to the freshwater bryozoan *Fredericella sultana*. *Parasitology* 133, pp. 701–709.
- Morris, D.J., Adams, A., Richards, R.H. (2000). In situ hybridisation identifies the gill as a portal of entry for PKX (Phylum Myxozoa), the causative agent of proliferative kidney disease in salmonids. *Parasitology Research* 86, pp. 950–956.
- Nesnidal, M.P., 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. e54576.
- 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.
- Özbek, S., Engel, U., Engel, J. (2002a). A switch in disulfide linkage during mini-collagen assembly in Hydra nematocysts or how to assemble a 150-bar-resistant structure. *Journal of Structural Biology* 137, pp. 11–14.
- Özbek, S., Pertz, O., Schwager, M., Lustig, A., Holstein, T.W., Engel, J. (2002). Structure/Function Relationships in the Minicollagen of Hydra Nematocysts. *The Journal of Biological Chemistry* 277, pp. 49200–49204.
- Palenzuela, O., Redondo, M.J., Alvarez-Pellitero, P. (2002). Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot

(*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology* 124, pp. 369–379.

Patra, S., Hartigan, A., Morris, D.J., Kodádková, A., Holzer, A.S. (2016). Experimental transmission of *Tetracapsuloides vermiformis* n. sp. from Bryozoa to fish and new guidelines for describing species belonging to the Malacosporea (Cnidaria: Myxozoa). Submitted in *Journal of Eukaryotic Microbiology*.

Pawlowski, J., Montoya-Burgos, J.I., Fahrni, J.F., Wüest, J., Zaninetti, L. (1996). Origin of the Mesozoa inferred from 18S rRNA gene sequences. *Molecular Biology and Evolution* 13, pp. 1128–1132.

Pond, S.L.K., Frost, S.D.W., Muse, S.V. (2005). HyPhy: hypothesis testing using 1071 phylogenies. *Bioinformatics* 21, pp. 676–679.

Rambaut, A. (2009). FigTree v. 1.3.1 2006–2009. <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>>.

Reed, C.C., Basson, L., Van As, L.L. (2003). Myxozoans infecting the sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* in the Okavango River and Delta, Botswana, including descriptions of two new species, *Henneguya samochimensis* sp. n. and *Myxobolus gariepinus* sp. n. *Folia Parasitologica* 10, pp. 183–189.

Rocha, S., Casal, G., Al-Quraishy, S., Azevedo, C. (2013). Morphological and molecular characterization of a new myxozoan species (Myxosporea) infecting the gall bladder of *Raja clavata* (Chondrichthyes), from the Portuguese Atlantic coast. *Journal of Parasitology* 99, pp. 307–317.

Saulnier, D., Philippe, H., De Kinkelin, P. (1999). Molecular evidence that the proliferative kidney disease organism unknown (PKX) is a myxosporean. *Diseases of Aquatic Organisms* 36, pp. 209–212.

Shimodaira, H., Hasegawa, M. (2001). CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics* 17, pp. 1246–1247.

Shin, S.P., Nguyen, V.G., Jeong, J.M., Jun, J.W., Kim, J.H., Han, J.E., Baek, G.W., Park, S.C. (2014). The phylogenetic study on *Thelohanellus species* (Myxosporea) in relation to host specificity and infection site tropism. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 72, pp. 31–34.

Shostak, S. (1993). A symbiogenetic theory for the origin of cnidocysts in Cnidaria. *BioSystems* 29, pp. 49–58.

Schlegel, M., Lom, J., Stechmann, A., Bernhard, D., Leipe, D., Dyková, I., Sogin, M.L. (1996). Phylogenetic analysis of complete small unit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria. *Archiv für Protistenkunde* 147, pp. 1–9.

Siddall, M. E., Martin, D.S., Bridge, D., Cone, D.M., Dessler, S.S. (1995). The demise of a phylum of protists: Myxozoa and other parasitic Cnidaria. *Journal of Parasitology* 81, pp. 961–967.

- Sitjà-Bobadilla, A., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T., Holland, J.W., Secombes, C.J. (2015). Chapter 14. Myxozoan Evolution, Ecology and Development (ed. Okamura, B., Bartholomew, J., Gruhl, A.), pp. 253–280, Springer International Publishing, Switzerland.
- 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.
- Stover, B.C., Muller, K.F. (2010). TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11, p. 9.
- Tops, S., Curry, A., Okamura, B. (2005). Diversity and systematics of the Malacosporea (Myxozoa). *Invertebrate Biology* 124, pp. 285–295.
- \*Weill, R. (1934a). Contribution à l'étude des cnidaires et de leurs nématocystes. I. Recherches sur les nématocystes (morphologie, physiologie, développement). *Travaux Station Zoologie de Wimereux, Bordeaux*. pp. 1–347.
- \*Weill, R. (1934b). Contribution à l'étude des cnidaires et de leurs nématocystes. II. Valeur taxonomique du cnidome. *Travaux Station Zoologie de Wimereux, Bordeaux*. pp. 351–701.
- \*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.
- Whipps, C.M., Gossel, G., Adlard, R.D., Yokoyama, H., Bryant, M.S., Munday, B.L., Kent, M.L. (2004). Phylogeny of the Multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporea) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. *Journal of Parasitology* 90, pp. 618–622.
- Whipps, C.M., Kent, M.L. (2006). Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53, pp. 364–373.
- Wilson, G.A., Bertrand, N., Patel, Y., Hughes, J.B., Feil, E.J., Field, D. (2005). "Orphans as taxonomically restricted and ecologically important genes". *Microbiology* 151, pp. 2499–2501.
- Winnipenninckx, B.M.H., Van de Peer, Y., Backeljau, T. (1998). Metazoan relationships on the basis of 18S rRNA sequences: a few years later. *American Zoologist* 38, pp. 888–906.
- Wissler, L., Gadau, J., Simola, D. F., Helmkampf, M., Bornberg-Bauer, E. (2013). "Mechanisms and Dynamics of Orphan Gene Emergence in Insect Genomes". *Genome Biology and Evolution* 5, pp. 439–455.
- Wolf, K., Markiw, M.E. (1984). Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225, pp. 1449–1452.

Yamada, S., Morimoto, H., Fujisawa, T., Sugahara, K. (2007). Glycosaminoglycans in *Hydra magnipapillata* (Hydrozoa, Cnidaria): demonstration of chondroitin in the developing nematocyst, the sting organelle, and structural characterization of glycosaminoglycans. *Glycobiology* 17, pp. 886–894.

Yokoyama, H., Shirakashi, S. (2007). Evaluation of hyposalinity treatment on infection with *Enteromyxum leei* (Myxozoa) using anemonefish *Amphiprion* spp. as experimental host. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists* 27, pp. 72–77.

Zhang, Z.Q. (2011). Animal biodiversity: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness. *Zootaxa* 3148, pp. 7–12.

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.

\* Označené zdroje jsou citovány podle současné literatury, nikoli na základě četby původní práce.

## **16 Přílohy**

Následující pasáž o rozsahu třinácti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.