

**UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE**  
**Přírodovědecká fakulta**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**2007**

**Miroslav Hylíř**

**UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra parazitologie**



**MOLEKULÁRNÍ FYLOGENEZE, BIOLOGIE  
A KLASIFIKACE MIKROSPORIDIÍ PODLE  
MODELOVÝCH SKUPIN PARAZITUJÍCÍCH  
U TRICHOPTER A LEPIDOPTER.**

Molecular Phylogeny, Biology and Classification of the  
Microsporidia (Microsporidia, Fungi) According to the Model  
Groups from Caddis Flies (Insecta, Trichoptera) and Butterflies  
(Insecta, Lepidoptera).

**Mgr.Miroslav Hyliš**

**Disertační práce**  
Ph.D. Thesis

Školitel/Thesis Supervisor: Prof. RNDr. Jiří Vávra, DrSc.  
Školitel specialista/Thesis Advisor: Ing. Miroslav Oborník, PhD.

Praha 2007

„A vizte houby v lese. Tu nejen formy, ale i barvy vykouzlují v kráse závodící jedince. A to všechno splétají pouhé nitky houbové, nitky dlouhé tenké, pouze sem tam přehrádkou článkované. Zde tedy vlákna myslí, budují, malují. Jsem přesvědčen, že jest to tatáž energie v těchto nízkých bytostech, která v plazmě mozku Rafaela, Rembrandta, Mozarta, Beethovena byla činnou, když svá díla tvořili.“

Josef Velenovský, Přírodní filosofie I. IV.

## Poděkování

Rád bych poděkoval na tomto místě všem, kteří se jakkoli podíleli na vzniku této práce. Svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Vávrovi, DrSc. za vedení práce, trpělivost, i za to, že mne kdysi k mikrosporidiím přivedl, Mirkovi (Ing. Miroslavu Oborníkovi, PhD.) za dlouhodobé poskytnutí laboratorního zázemí, know-how i operativní spolupráci, RNDr. Jaroslavu Weiserovi, DrSc. za poskytnutí materiálové a informační základny pro sestavení reprezentativního vzorku pro analýzu i konzultace, Janě (Ing. Janě Nebesářové, CSc.) za poskytnutí laboratorního zázemí (vč. přístřeší) i v době kdy jsme ještě nebyli bližší spolupracovníci, Daniele (Dr. Daniele Pilarské, Institut Zoologie, Bulharské akademie věd) za pomoc s izolací několika druhů, partě na oddělení parazitologie PřF UK za přátelské pracovní prostředí a jmenovitě Petrovi (Prof. RNDr. Petru Horákovi, PhD.) za kamarádskou, Hele (RNDr. Heleně Kulíkové) za lidskou a Doc. RNDr. Josefu Chalupskému a Jiřímu Hadincovi (herbářové sbírky PřF UK) za intelektuální podporu v době, kdy byla potřeba.

Dílu Zdeňka Neubauera a Bohuslava Martinů za nevyčerpatelnou inspiraci, všem přátelům a láskám minulým i současným, že byli a jsou, ale nejvíce svým rodičům (a užší rodině) za nepodmíněnou lásku, zázemí i nekonečnou svobodu pro realizaci svých koníčků, mezi které patří i mikrosporidie.

Poděkování a omluvu bych rád vyjádřil i oponentům kvůli zpožděnému odevzdáním práce a obtížnějším formulacím ne zcela jednoduchých souvislostí tématu.

Práce byla podporována následujícími granty: MŠMT 30-801, FRVŠ 1789/2001 (oba Ministerstvo školství) a Z60220518 (GA ČAV).

Prohlašuji jménem spoluautorů, že výsledky prezentované v doktorské práci Miroslava Hyliše jsou v naprosté většině jeho vlastním dílem a autor se významnou mírou podílel na jejich realizaci.

V Praze, 18. 8. 2007

Prof. RNDr. Jiří Vávra, DrSc.  
školitel

Prohlašuji, že jsem práci, ani její podstatnou část nepředložil k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 8. 2007

Miroslav Hyliš

# OBSAH

1.	<b>ÚVOD</b>	1
2.	<b>MIKROSPORIDIE - LITERÁRNÍ RESUMÉ</b>	2
2.1	Charakteristika a postavení v rámci eukaryot	2
2.2	Taxonomie a klasifikace	3
2.2.1	Mikrosporidie Trichoptera	5
2.2.2	Mikrosporidie Lepidoptera	7
2.3	Fylogenetické vztahy (uvnitř skupiny)	10
2.3.1	Metodická východiska	10
2.3.2	Současný stav a diskrepance fylogeneze s taxonomií/klasifikací a hostitelskou příslušností	12
3.	<b>CÍLE PRÁCE</b>	15
3.1	Metodiky	16
4.	<b>PUBLIKACE</b>	17
4.1	Hylíš M., Oborník M., Vávra J. XXXX. <i>Zelenkaia trichopterae</i> gen. et sp. nov. (Microspora, Fungi), an Aquatic Disporoblastic Microsporidian Parasite of Caddis Flies (Trichoptera, Insecta). (draft připravený k publikaci)	18
4.2	Hylíš M., Oborník M., Nebesářová J., Vávra J. 2007. Aquatic tetrasporoblastic microsporidia from caddis flies (Insecta, Trichoptera): Characterisation, phylogeny and taxonomic reevaluation of the genera <i>Episeptum</i> Larsson, 1986, <i>Pyrotheca</i> Hesse, 1935 and <i>Cougourdella</i> Hesse, 1935. <i>Eur. J. Protistol.</i> 43 (3): 205-224.	19
4.3	Hylíš M., Pilarska D. K., Oborník M., Vávra J., Solter L. F., Weiser J., Linde A., and McManus, M. L. 2006. <i>Nosema chrysorrhoeae</i> n. sp. (Microsporidia), isolated from browntail moth ( <i>Euproctis chrysorrhoea</i> L.) (Lepidoptera, Lymantriidae) in Bulgaria: Characterization and phylogenetic relationships. <i>J. Invertebr. Pathol.</i> 91, 105-114.	20
4.4	Vávra J., Hylíš M., Vossbrinck C.R., Pilarska D.K., Linde A., Weiser J., McManus M.L., Hoch G., Solter L.F. 2006. <i>Vairimorpha disparis</i> n. comb. (Microsporidia: Burenellidae): A redescription and taxonomic revision of <i>Thelohania disparis</i> Timofejeva 1956, a microsporidian parasite of the gypsy moth <i>Lymantria dispar</i> (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). <i>J. Eukaryot. Microbiol.</i> 53 (4): 292-304.	21
4.5	Vávra J., Hylíš M., Oborník M., Vossbrinck C. R., 2005. Microsporidia in aquatic microcrustacea: the copepod microsporidium <i>Marssoniella elegans</i> Lemmermann, 1900 revisited. <i>Folia Parasitologica</i> 52 (1-2), 163-172.	22
4.6	Hylíš M., Weiser J., Oborník M., Vávra J., 2005. DNA isolation from museum and type collection slides of microsporidia. <i>J. Invertebr. Pathol.</i> 88, 257-260.	23
4.7	<b>Abstrakty</b>	24
4.7.1	Solter L., D'Amico V., Goertz D., Hoch G., Hylíš M., Linde A., McManus M., Novotný J., Pilarska D, Solter P., Vávra J., Weiser J. and Zubrik M. 2004. Research on microsporidia as potential classical and augmentative biological control agents of the gypsy moth. Proceedings, XV USDA Interagency Research Forum on Gypsy Moth and Other Invasive Species 2004. Book of Abstracts.	24
4.7.2	Hylíš M., Oborník M., Vávra J., 2004. Trichopteran microsporidia: characterisation, variability and discrepancy between phylogeny and classification. NATO Advanced Research Workshop "Emergent Pathogens in the 21st Century: First United Workshop on Microsporidia from Invertebrate and Vertebrate Hosts", České Budějovice, Czech Republic, July 12-15, 2004. Book of Abstracts.	24
5.	<b>SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ</b>	25

<b>6. ZÁVĚR - DISKUSE</b>	<b>27</b>
<b>7. CITACE</b>	<b>32</b>

# 1. ÚVOD

Mikrosporidie představují skupinu jedinečných, výjimečně úspěšných, jednobuněčných, obligátně parazitických eukaryot, u kterých se díky jejich „prosté i důvtipné“ životní strategii kombinovaného šíření (injikace do cytoplazmy hostitelské buňky a transport v environmentálním prostředí) vyskytují současně 2 základní a většinou protichůdné anagenetické tendence. První, redukční je adaptací k intracelulárnímu (a relativně málo specifickému - napříč spektrem hostitelů) prostředí uvnitř hostitelské buňky. Druhou (většinou opačnou) anagenetickou tendencí, doprovázenou vzrůstem komplexity jsou adaptace k prostředí vnějšmu a šíření v něm (v biotickém mimo hostitelskou buňku i abiotickém). Výsledkem první jsou buněčné (organelové), genové i genomové redukce, které posouvají mikrosporidie na úroveň symbiotických „semientit“ přítomných téměř ve všech živočišných kmenech a přesahujících i do některých zástupců okolních superříší, svázaných s živočichy ekologicky. Výsledkem druhé je obrovská diverzita v morfologii spor a složité vývojové (životní) cykly, s mezihostiteli i uvnitř 1 hostitele, v rámci vertikálních a horizontálních přenosů.

Tento „rozběžný“ stav se promítá i do současné diskrepance mezi fylogenezí mikrosporidií (vztahy uvnitř skupiny) a taxonomií s klasifikací.

Fylogenezi tak rekonstruujeme z informací o změnách „konzervativních“ genů různého stupně redukce, zatímco taxonomie a klasifikace byly dosud vytvářeny podle strukturálně-vývojových znaků různého stupně rozvoje (vč. zpětného). Věrná rekonstrukce fylogeneze, kde máme stále nedostatek dat, objektivní vážení strukturálních znaků a sjednocení obou přináší zjevné problémy.

Tato práce shrnuje poznatky o mikrosporidiích dvou velmi příbuzných hostitelských skupin (Trichoptera a Lepidoptera), které mají odlišná rodová spektra, odpovídající akvatickému a terestrickému prostředí výskytu hostitelů. Přesto měli tito hostitelé relativně nedávno společného předka, doložitelného paleontologicky i fylogeneticky. Kladogeneze mnoha parazitů kopíruje kladogenezi hostitelů, proto sledování takových vztahů u těchto původnějších, možná méně atraktivních skupin hostitelů (ve srovnání s lidskými či obratlovčími) přináší cenné informace o fylogenezi i vlastní biologické podstatě těchto parazitů.

Práce popisuje několik nových druhů mikrosporidií, jeden rod je vytvořen reklasifikací, jeden zcela nový navržen, jsou reevaluovány strukturální znaky použitelné pro současnou taxonomii a klasifikaci a charakterizovány fylogenetické vztahy uvedených skupin mikrosporidií. Na jejich základě a poznatcích biologie mikrosporidií z Trichoptera je předložen i nový jednotlicí model fylogeneze mikrosporidií, v němž hrají centrální roli hostitelští korýši, ze kterých předci většiny známých mikrosporidií pravděpodobně radiovali do ostatních hostitelských skupin.



## 2. MIKROSPORIDIE - LITERÁRNÍ RESUMÉ

### 2.1 Charakteristika a postavení v rámci eukaryot

Mikrosporidie jsou relativně velkou a od ostatních výrazně odlišnou skupinou mikroskopických jednobuněčných eukaryot, obligátně intracelulárních parazitů téměř všech živočišných kmenů (Animalia/Metazoa, Opisthokonta). Napadají i parazitická myxosporidia (Myxosporidia/Myxozoa) a přesahují do okolní eukaryotické superříše Chromalveolata: parazitují některé nálevníky (Ciliophora) a gregariny (Apicomplexa). Do současnosti je popsáno nejméně 1300 druhů mikrosporidií (Larsson, 1999) ve více než 150 rodech (Wittner a Weiss, 1999; Keeling a Fast, 2002; recentní popisy nových rodů). Těžiště druhů je ve členovcích (Arthropoda), především v korýších (Crustacea) a v hmyzu (Insecta, Hexapoda), z obratlovců v rybách (Canning a Lom, 1986); u člověka parazituje nejméně 13 druhů mikrosporidií (Wittner a Weiss, 1999; Keeling a Fast, 2002). Znalosti parazitace jednotlivých skupin hostitelů jsou velmi nerovnoměrné, ale v některých rozsáhlých hostitelských skupinách chybí (ostnokožci – Echinodermata) či mají velmi řídké zastoupení (měkkýši - Mollusca, ptáci - Aves) (Sprague, 1977; Wittner a Weiss, 1999).

Historicky byla tato mikrobiální eukaryota řazena díky zdánlivé homologii strukturálních znaků do nejrůznějších taxonomických skupin protozoí: nejdelší dobu mezi Sporozoa (Leuckart, 1879) - Cnidosporidia (Doflein, 1901) (přehled podává např. Weiss a Vossbrinck, 1999), později byly mikrosporidie na základě výjimečných buněčných a molekulárních znaků, zcela neobvyklých pro eukaryotické organizmy (viz.dále), řazeny dokonce mezi starobylá eukaryota, amitochondriální protista souhrnně nazývaná Archezoa (Cavalier-Smith, 1983). Od roku 1994 bylo ale postupně charakterizováno množství genů, které jejich postavení výrazně měnilo a posouvalo do oblasti vyšších eukaryot resp. hub (Endlich a kol., 1996; Keeling a Doolittle, 1996; Kamiashi a kol., 1996; Hinkle a kol., 1997; Germot a kol., 1997; Hirt a kol., 1997; Peyretaillade a kol., 1998). Pozdější práce přinesly nezvratné důkazy, že mikrosporidie jsou buď odvozeny z hub (Fast, Logsdon, and Doolittle 1999; Hirt et al. 1999; Keeling, Luker, and Palmer 2000; Van de Peer, Ben Ali, and Meyer 2000; Gill and Fast 2006) nebo jsou její sesterskou skupinou (Tanabe, Watanabe, and Sugiyama 2005; James et al. 2006; Liu, Hodson, and Hall 2006). V současné době převažuje názor, že se mikrosporidie vyvinuly z původnějších zástupců polyfyletické (a bazální houbové) skupiny Chytridiomycota nebo ze společných předků s nimi.

Klíčové postavení v celé biologii mikrosporidií má spora s vystřelovacím aparátem (Vávra a Larsson, 1999), který je v podobě známé u mikrosporidií unikátní adaptací zodpovědnou za evoluční úspěšnost těchto všudypřítomných parazitů. Významná je i existence dvou různých životních forem, které podléhají zcela odlišným evolučním tlakům. Vegetativní, aktivně nepohyblivá stádia merogonie a sporogonie jsou striktně vázaná na intracelulární prostředí hostitelské buňky, zatímco spory jsou jediná volná stádia mimo ni a většinou i hostitele (environmentální prostředí). Právě intracelulární prostředí připravilo selektivní tlaky pro redukce na mnoha úrovních „biologické organizace“ mikrosporidií: od buněčných struktur přes genové a metabolické až po genomické (Keeling a Fast, 2002, Gill a Fast, 2006). Mikrosporidie mají řadu strukturálně atypických organel: klasické mitochondrie jsou redukovány na

mitosomy, zadní vakuola je pravděpodobně homologem peroxisomů (Findley a kol. 2005), mají primitivní Golgiho komplex a další organely zcela chybí: rezervní inkluze, centrioly, bičíky. Ribozomy jsou podobné prokaryotickým: 70S (Ishihara, Hayashi, 1968; Cury a kol., 1980), mají fúzovanou 5,8S a 28S rRNA resp. absenci ITS 2 (Vosbrinck a Woese, 1986). Genom známých mikrosporidií se pohybuje v rozsahu 19,5 Mbp (*Glugea antherinae*) a 2,3 Mbp (*Encephalitozoon intestinalis*), druhý jmenovaný je v současnosti s výjimkou nukleomorfů některých endosymbiotických červených a zelených řas kryptomonád (Douglas a kol., 2001) a chlorarachniofyt (Gilson a McFadden, 2002) nejmenší známý jaderný eukaryotický genom. Počet chromozomů známých mikrosporidií je dokumentován v rozsahu 7-16 (Weiss a Vossbrinck, 1999). Milníkem ve studiu mikrosporidií bylo kompletní osekvenování genomu druhu *Encephalitozoon cuniculi* (2,9 Mbp, 11 lineárních chromozomů, 1997 potenciálně protein kódujících genů) (Katinka a kol., 2001), které odhalilo extrémní stupeň redukce na úrovni genomu, genů i celých metabolických drah: málo genů a jejich vysoká denzita, málo repetitivních sekvencí a transponibilních elementů, nízká hustota i krátká délka intronů, ztráta genů pro některé biosyntetické dráhy. Výčet specifík konkrétních genů a jejich produktů shrnují Gill a Fast, 2006 a Brosson a kol., 2006. Současně probíhá postgenomické studium proteinů *E.cuniculi* a některých dalších modelových mikrosporidií a (jaderný) genomový projekt dalšího druhu *Antonospora locustae*.

## 2.2 Taxonomie a klasifikace

Taxonomie a klasifikace mikrosporidií mají velmi dlouhou historii a byly a jsou až do současné doby odvozovány ze strukturálních a vývojových znaků (znaků vývojového cyklu), dostupných metodikám své doby. Revizi a shrnutí prvotních klasifikací podal Kudo (1924).

První moderní klasifikaci navrhl Tuzet a kol. (1971), který použil dřívější rodovou charakteristiku sporoforního měchýřku (SPOV) („pansporoblast membrane“ (Gurley, 1893) a „capsule envelopante“ (Labbé, 1899)) k rozlišení mikrosporidií na úrovni podřádů (třída MICROSPORIDEA, řád MICROSPORIDA, podřády 1. APANSPOROBLASTINA 2. PANSPOROBLASTINA).

Weiser (1977) v následující klasifikaci zachytil korelaci mezi přítomností sporoforního měchýřku a jaderným stavem ve sporogonii. Stanovil třídy METCHNIKOVELLIDEA a MICROSPORIDIDEA, které odlišil na základě rozdílů v morfologii spor a SPOV. Druhou třídu „klasických mikrosporidií“ (MICROSPORIDIDEA) rozdělil podle charakteristiky jaderného stavu sporogonie a spor na řády 1. PLEISTOPHORIDIDA a 2. NOSEMATIDIDA.

Sprague (1977) prezentoval souběžně analogickou klasifikaci se 2 třídami: RUDIMICROSPOREA (s řádem METCHNIKOVELLIDAE) a MICROSPOREA (s řády 1. CHYTRIDOPSIDA a 2. MICROSPORIDA). Druhý řád měl podřády APANSPOROBLASTINA a PANSPOROBLASTINA. Rok dříve se sice objevily ve Vávra (1976) Spraguem výstižněji definované podřády DIPLOKARYONINA a MONOKARYONINA, které se měly dostat do uvedené klasifikace na místo řádu

APANSPOROBLASTINA, ale nedostaly (údajným nedopatřením) (Sprague et al., 1992).

Následné, různě modifikované revize byly založené na kombinaci všech výše uvedených znaků spolu se zapracovanými novými ultrastrukturálními znaky pro nižší taxonomické úrovně (Issi (1986) – vystřelovací aparát, Larsson (1986) – široká kombinace znaků, Canning (1990) – kombinace znaků, jejich oddělení od jaderné fáze.

(Ve své době domnělý) hlavní nedostatek všech předcházejících klasifikací byl, že nerozlišovaly dostatečně mezi druhy, které mají izolovaná jádra celý vývojový cyklus a těmi, u kterých se diplokaryon objevuje v nějaké fázi životního cyklu (Canning, 1990).

To vyústilo v zásadní změnu v poslední publikované (a platné) klasifikaci (Sprague et al., 1992), která nadřadila chromozomové cykly v životním resp. dílčích vývojových cyklech (u dimorfních a vícehostitelských mikrosporidií) nad všechny stávající znaky. Dosavadní, od ostatních výrazně odlišná skupina, řazená tradičně odděleně od „klasických“ mikrosporidií a považovaná za nejpůvodnější zůstala nezařazena v appendix, taxa incertae sedis, na úrovni (v) čeledi Metchnikovellidae. Premisou uvedeného klasifikačního systému je to, že každá ze dvou částí diplokaryonu je haploidní a že diplokaryon funguje jako genetický a fyziologický ekvivalent diploidního stavu (Raper, Flexner, 1970). Dále že u všech mikrosporidií existují dva základní typy chromozomových cyklů. První typ obsahuje během životního cyklu diplokaryotická (diploidní) stádia, tzv. dihaplofáze (třída 1. DIHAPLOPHASEA) a druhý, který je haploidní, tzv. haplofáze (třída 2. HAPLOPHASEA). Současně autoři postulovali, že většina (možná všechny) druhy s dihaplofází mají také haplofázi - v jiné části vývojového cyklu, která nemusí být známá a může existovat v jiném hostiteli. Haploidní stav může být nastolen při meiozi (řád 1. Meiodihaplophasida) a nebo při oddělení jader diplokarya (řád 2. Dissociodihaplophasida). Současný platný klasifikační systém pro vyšší taxonomické jednotky tedy je:

kmen MICROSPORA Sprague, 1969

třída 1. DIHAPLOPHASEA

řád 1. Meiodihaplophasida

řád 2. Dissociodihaplophasida

třída 2. HAPLOPHASEA

Nižší taxonomické jednotky (nadčeledi, čeledi, rody) jsou definovány podle komplexu morfologických, ultrastrukturálních a vývojových charakteristik: zda se vytváří jeden (homosporous) nebo 2, 3 typy spor, typ sporogonie a výsledný počet sporoblastů z původního sporotu, přítomnost a typ SPOV, ultrastruktura polaroplastu a dalších částí spory i SPOV a fyziologicko-patologických útvarů hostitelské buňky (Sprague et al., 1992).

Můžeme shrnout, že se všechny klasifikační systémy do současnosti potýkaly s nedostatkem velkých strukturálně-vývojových znaků použitelných pro vyšší taxonomické jednotky a nadbytkem malých často minuciézních znaků (Larsson, 1986, 1999) a s problémy objektivního vážení obou. V taxonomii, která kopíruje aktuální stav klasifikačních názorů, vycházejících ze strukturálních dat, tak zůstávala stabilnější jen jména rodů. I ta se v současné době mění, ovšem už díky molekulárně taxonomickým znakům.

## 2.2.1 Mikrosporidie Trichopter

Do současnosti bylo popsáno u Trichopter nejméně 25\* druhů mikrosporidií řazených do 13\* rodů (*Amblyospora* (4), *Cougourdella* (2) *Chytridiopsis* (1), *Episeptum*\* (6), *Gurleya* (2), *Issia* (1), *Paraepiseptum*\* (1), *Pyrotheca* (1), *Pegmatheca* (1), *Tardivesicula* (1), *Thelohania* (3), *Vavraia* (1), *Zelenkaia*\* (1)).

\* údaj se týká i nových druhů, 2 překlasifikovaných/1 vytvořeného a 1 nově navrženého rodu v této práci.

Mikrosporidie Trichopter tvoří morfologicky velice heterogenní skupinu, kterou můžeme podle základního, tradičního dělení (Canning a Vávra, 2000) rozdělit do 5 hlavních skupin podle počtu spor tvořených ve sporogonii ve SPOV (charakteristiky se týkají druhů z Trichopter, nemusí být zcela shodné s charakteristikou typových druhů) (viz. Sprague a kol., 1992, Canning a Vávra, 2000).

- 1) *Chytridiopsis* – polysporoblastický rod s 8, 12 nebo 16 sporamai ve silnostěnném SPOV a volnými sporamai v parazitoforní vakuole (2 typy sporogonie)
- 2) *Tardivesicula*, *Vavraia* – polysporoblastické rody se 16-32 sporamai resp. cca 40-100 microsporami nebo 8-cca 40 macrosporami.
- 3) *Amblyospora*, *Pegmatheca*, *Thelohania* - oktosporoblastické rody.
- 4) *Cougourdella*, *Gurleya*, *Episeptum*, *Paraepiseptum*, *Pyrotheca* - tetrasporoblastické rody.
- 5) *Issia*, *Zelenkaia* – disporoblastické rody.

Následující výčet podává základní charakteristiku a stav znalostí o zástupcích jednotlivých rodů použitelné pro srovnávací studii „biologických znaků“ (strukturálních, vývojových, ekologických) s molekulárně taxonomickými znaky (v případě jediného zástupce rodu je uvedené celé jméno):

*Chytridiopsis trichopterae* Larsson, 1993, parazit střevního epitelu larev *Polycentropus flavomaculatus*, je mikrosporidie zcela výjimečných strukturálních vlastností, kulovité (jednojaderné) spory dvojí velikosti, není znám kompletní životní cyklus, nebyla zachycena merogonie, dvojí typ sporogonie (výše), provedena ultrastrukturální studie potvrzující atypickou stavbu SPOV i spor (pólového vlákna a především zcela netypického rudimentálního polaroplastu - „membraneous chambers, resembling a honeycomb“).

*Tardivesicula duplicata* Larsson a Bylén, 1992, parazit tukového tělesa larev *Limnephilus centralis* s tyčinkovitými mírně zakřivenými jednojadernými sporamai, celý životní cyklus izolovaná jádra, polysporoblastická sporogonie s rozetovitým pučením, fragilní SPOV, ultrastrukturální charakterizace odlišuje druh (rod) od příbuzných rodů *Flabelliforma* a *Cystosporogenes*.

*Vavraia holocentropi* Larsson, 1986, parazit larev *Holocentropus dubius*, generalizované infekce všech orgánů a tkání, izolovaná jádra v celém životním cyklu, oválné jednojaderné spory, merontogenetický SPOV s dvouvrstevným obalem. Ultrastrukturální studie provedena u popsaného druhu.

Druhy rodu *Amblyospora*, všichni parazité tukového tělesa několika čeledí Trichopter, tvoří kompaktní strukturálně dobře definovanou skupinu. Vývojový cyklus je ale popsán jen u několika druhů a nedokonale, s diplokaryotickou fází ve sporogonii a oválnými jednojadernými sporami. Kompletní životní cyklus srovnatelný s druhy z komárů chybí. U *A.callosa*, Hazard a Oldacre, 1975 je popsán dimorfní vývojový cyklus obsahující vedle oktosporoblastické sekvence i diplokaryotické volné spory v jedné hostitelské larvě. Ultrastrukturálně jsou popsány 3 druhy rodu *Amblyospora*: *A.callosa*, Hazard a Oldacre, 1975, *A. trichostegiae* (Baudoin, 1969) a *A. undulata* Larsson, 1981. Všechny vykazují podobné ultrastrukturální znaky.

Druhy rodu *Thelohania*, všichni parazité tukového tělesa larev dravých čeledí Trichopter jsou nedostatečně, pouze světelnou mikroskopií popsané mikrosporidie, které se podle dostupných informací částečně překrývají s rodem *Amblyospora* popsaných z Trichopter (Larsson, 1981). *Thelohania plectrocnemiae* Weiser, 1946 i *Thelohania lairdii* Weiser, 1965 jsou popsány resp. později dokumentovány (Canningová a Vávra, 2000) ve smíšených infekcích s disporoblastickou *Issia trichopterae*, Weiser, 1946 – to zda se nejedná o jednu dimorfní mikrosporidii není dosud vyřešeno. Celkově jsou druhy rodu *Thelohania* nedostatečně prozkoumány, není znám kompletní životní cyklus ani ultrastrukturální charakterizace.

*Pegmatheca lamellata*, Larsson, 1987 poslední z oktosporoblastické skupiny, parazit larev rodu *Limnephilus* infikující tukové těleso, svalovinu a vaječníky. Oválné jednojaderné oktospory jsou v trvalém SPOV. 2 merogoniální cykly, s diplokaryotickým uspořádáním jader, druhá merogonie produkuje silnou vrstvu exkrečního materiálu nad cytoplazmatickou membránou. Oktosporoblastická sporogonie probíhá pučením rozetovitého plazmodia. Ultrastruktura spor a SPOV vykazuje řadu specifických znaků: lamelární inkluze SPOV počátečních fází sporogonie, později četné tubulární inkluze homologického původu s exosporou.

Stav znalostí o tetrasporoblastických mikrosporidiích rodů *Cougourdella*, *Gurleya*, *Episeptum*, *Paraepiseptum*, *Pyrotheca* je důkladně popsán spolu s revizí a popisem nových druhů v kapitole 4.2, v jedné z předkládaných publikací této práce.

*Issia trichopterae* (Weiser, 1946) (dříve *Pérezia t.* resp. *Glugea t.*), parazit tukového tělesa larev *Plectrocnemia geniculata* (zachycená i v *Polycentropus flavomaculatus*) je jediná dosud popsaná disporoblastická mikrosporidie z Trichopter. Popis je znám jen ze světelné mikroskopie, nedostatečně a nejednoznačně dokumentován: v původním popisu (Weiser, 1946) chybí zmínka o SPOV i jaderném stavu spor – v obrazové dokumentaci je jen jedna kresba spory se 2 jádry, další kresby sporogonie i sporoblastů naznačují ale jednojadernost (a záměnu 2. jádra s posterosomem). Následující práce (Weiser, 1961, Weiser, 1966) zmiňují již SPOV („pansporoblast“), a v systému (Weiser, 1977) jsou spory uvedeny jako „binuclear“. V Issi (1986) je u rodu uveden již diplokaryotický stav: „stadia sporogonie i spory imejnt diplokaryony“, tato definice rodu je převzata i v Canning a Vávra (2000) včetně

kreseb. Přezkoumání typového materiálu objevilo přítomnost jiného (oktosporoblastického) typu spor (Canning a Vávra, 2000). Podle našeho srovnání syntypových preparátů jsme nebyli schopni jaderný stav spor určit, přítomnost oktosporové sekvence (či kontaminace - viz dále) se potvrdila.

*Zelenkaia trichopterae* gen. et sp. nov., typový druh nově navrženého rodu je charakterizován a popsán v kapitole 4.1 v jedné z předkládaných publikací této práce.

Rody *Tardivesicula*, *Episeptum*, *Paraepiseptum*, *Issia*, *Zelenkaia* jsou popsány výlučně z chrostíků (Trichoptera), rod *Pegmatheca* i dvoukřídlých (Diptera–Simuliidae), *Chytridiopsis* navíc z brouků (Coleoptera), stonožkoců (Myriapoda), pavoukoců (Arachnida) a kroužkoců (Annelida); *Vavraia* z dvoukřídlých (Diptera–Culicidae, Psychodidae), primitivních motýlů (čel.Hepialidae) a dekapodních korýšů (Crustacea, Decapoda), *Amblyospora* z několika čeledí dvoukřídlých (Diptera) a skupin korýšů (Crustacea: Amphipoda, Cladocera); zástupci rodu *Thelohania* z několika řádů korýšů (Crustacea), ale i mnoha skupin hmyzu (Insecta: Coleoptera, Ephemeroptera, Hymenoptera, Odonata, ), dále parazitují u chvostokoků (Collembola), pavoukoců (Arachnida), tasemnic (Cestoda) a některých obratlovců (Vertebrata: Pisces, Reptilia, Mammalia) #, rod *Gurleya* má zástupce známé rovněž z několika řádů korýšů (Crustacea), řádů hmyzu (Insecta: Diptera, Ephemeroptera, Isoptera, Odonata), raritní zástupce má i v roztočích (Arthropoda, Arachnida, Acari) a nálevnicích (Ciliata), rody *Pyrotheca* a *Cougourdella* jsou kromě chrostíků (Trichoptera) popsány z jediné podtřídy korýšů-klanonožců (Crustacea, Maxillopoda, Copepoda) #

Ekologické charakteristiky jako kompletní životní cyklus, způsob přenosu či hostitelská specificita jsou u všech prakticky neznámé. U většiny zástupců je dokumentována jen sporogoniální část vývojového cyklu.

# mnoho zástupců těchto rodů již bylo překlasifikováno do jiných včetně několika uvedených v předkládaných publikacích kap. 4.2 a 4.4 (viz. také kap. 2.3.2).

## 2.2.2 Mikrosporidie Lepidopter

Z Lepidopter byla popsána první známá mikrosporidie *Nosema bombycis* Naegeli, 1857 a do současnosti několik desítek druhů mikrosporidií. Druhy jsou dnes řazeny do 8 rodů (*Cystosporogenes* (1), *Endoreticulatus* (n<sup>\*</sup>), *Gurleya* (1), *Larssoniella* (1), *Nosema* (n<sup>\*</sup>), *Orthosomella* (2), *Vairimorpha* (n<sup>\*</sup>), *Vavraia* (1)).

Starší nerevidované popisy uvádí ještě *Glugea*, *Stempelina*, *Octosporea*, *Perezia*, *Pleistophora*, *Thelohania*. Zástupci rodu *Pleistophora* jsou recentně klasifikovány do rodů *Endoreticulatus* a *Cystosporogenes*, zástupci rodu *Thelohania* do rodu *Vairimorpha*. Zbylé rody jsou s největší pravděpodobností nesprávně, pouze na základě světelné mikroskopie zařazené druhy.

\* údaj nelze přesně uvést kvůli chybnému zařazení mnoha druhů: synonymním popisům téhož druhu (např. *Nosema bombycis*, *Nosema mesnili*) (Sprague, 1977; Larsson, 1979; Malone a McIvor, 1996) i popisům komplexu druhů (*Pleistophora*

*schubergii*) (Sprague, 1977) které jsou recentně klasifikovány jako samostatné druhy (Cali a Garhy, 1991), (Wang a kol., 2005).

Mikrosporidie z Lepidopter můžeme podle tradičního dělení (Canning a Vávra, 2000) orientačně rozřídít do základních 5 skupin podle počtu spor tvořených ve sporogonii, přítomnosti SPOV a přítomnosti diplokaryonu:

- 1) *Endoreticulatus*, *Cystosporogenes*, *Vavraia* – polysporoblastické (monokaryotické) rody s 8,16,32-64 sporami ve SPOV či bez něj .
- 2) *Vairimorpha* – dimorfní rod s oktosporoblastickou sporogonií ve SPOV (analogickou rodu *Thelohania*) a volnou disporoblastickou sporogonií (shodnou s rodem *Nosema*).
- 3) *Gurleya* – tetrasporoblastický rod, SPOV.
- 4) *Nosema* – disporoblastický diplokaryotický rod, bez SPOV.
- 5) *Larsoniella*, *Orthosomella* – monomorfní, monokaryotické rody, bez SPOV.

Následující výčet podává základní charakteristiku a stav znalostí o zástupcích rodů:

Druhy rodu *Endoreticulatus*, jsou popisovány jako parazité epitelu střeva z různých čeledí Lepidopter, dokumentován jen perorální přenos. Jde o monomorfní rod mikrosporidií s izolovanými jádry v celém životním cyklu. Dvoujaderné meronty a merogoniální řetízkoovitá plazmodia s nepravidelným počtem jader jsou obklopeny přiléhající dvojitou membránou odvozenou z lamel endoplasmatického retikula (později parazitoforní vakuola), dělí se binárním dělením a plazmotomií. Ve sporogonii vznikají kulovitá i nepravidelná řetízkoovitá mnohojaderná plazmodia, která se postupnou plazmotomií dělí na nepravidelný počet sporoblastů (8, 16, 32, výjimečně 64) resp. oválných lehce prohnutých jednojaderných spor. Publikováno několik ultrastrukturálních studií, nejširší a shrnující podali Cali a Garhy (1991), přesto zůstávají pochybnosti ohledně existence SPOV. Pilarská a kol. (2002) referují o širší tkáňové specificitě izolátu *E. schubergi* z *Euproctis chryorrhoea* připomínající následující rod.

Rod *Cystosporogenes* je kromě následujících rozdílů ve zbytku prakticky identický s rodem *Endoreticulatus*: 1) má širší tkáňovou afinitu, kromě střevního epitelu (v počátečních fázích infekce) napadá nejvíce slinnou a snovací žlázu, postupně všechny orgány vč. vaječnicků, přenáší se perorálně i transovariálně. 2) nemá dvojitou, ale jen jednoduchou membránu neznámého původu, obklopující stádia od merontů po spory (analogickou vnitřní membráně rodu *Endoreticulatus*).

Jediný známý druh rodu *Vavraia* z Lepidopter *Vavraia oncoperae* (Milner & C.D. Beaton) Malone, Wigley & Dhana 1987 je popsán z blíže neurčeného druhu rodu *Wiseana* sp. z primitivní čeledi motýlů (Lepidoptera: Hepialidae) z Nového Zélandu. Velikostí spor i ultrastrukturou se druh podobá *V.culicis* (Malone, Wigley & Dhana, 1987), jinak je charakteristika shodná s rodovou, uvedenou v kapitole 2.2.1. (*V.holocentropi* z Trichopter má odlišnou velikost spor, jejich ultrastrukturu i způsob dělení ve sporogonii – Larsson, 1986b).

Druhy řazené do rodu *Vairimorpha* tvoří generalizované infekce prakticky všech orgánů u hostitelů z několika čeledí Lepidopter, oktosporoblastická sekvence je však referovaná u většiny popsaných druhů z tukového tělesa (Pilley, 1976; Malone, 1984; David, 1988; Vávra a kol., 2006); u typového druhu *V. necatrix* Pilley, 1976 navíc indukovaná teplotou pod 25°C (Pilley, 1976). Teplotní indukce se u jiných druhů nepotvrdila. Infekce se šíří perorálně i transovariálně. Je popsáno a ultrastrukturálně charakterizováno několik druhů, u několika dalších se očekává jejich překlasifikování do tohoto rodu z rodu *Thelohania*. Vývojový cyklus je s výjimkou oktosporoblastické sekvence sporogonie shodný s rodem *Nosema*, tj. celý s diplokaryotickým stavem jader, u sporontů počínajících octosporoblastickou sekvencí je dokumentována meioza, u některých její aberace resp. celá abortivní oktosporoblastická sporogonie (Canning et al., 1999). Meioza probíhá během separace jader diplokaryonu, současně s tvorbou SPOV. Ultrastrukturálně se oba typy spor liší, jednojaderné oktospory mají silnější stěnu spory a vyšší počet závitů pólového vlákna. Jejich funkce zůstává nejasná. Dvoujaderné spory disporoblastické sekvence mají protáhlejší tvar. Podobně jako u druhů rodu *Nosema* se v časné fázi infekce objevuje multiplikativní fáze vývoje ve střevě (enterocytech a hlavně svalovině) a oenocytech, kde se tvoří tenkostěnné ultrastrukturálně „neotenické“ tzv. časné spory (Iwano a Ishihara, 1991) které slouží k šíření uvnitř hostitele. Bližší charakterizace rodu je popsána v kap. 4. 4 v jedné z předkládaných publikací této práce.

*Gurleya secalisae* Thomson, 1960 je jediný druh rodu z motýlů popsaný sběžně světelnou mikroskopií z *Trachea secalis* (čel. Noctuidae) z Afriky. Podrobnější údaje chybí.

Druhy rodu *Nosema* tvoří nejpočetnější skupinu mikrosporidií z Lepidopter, jsou to parazité prakticky všech orgánů, u většiny z nich je dokumentován vedle perorálního i transovariálního přenos. Strukturálně tvoří rod dobře definovanou uniformní skupinu s diplokaryotickou merogonií i sporogonií v přímém kontaktu s cytoplasmou hostitelské buňky. Pravděpodobně většina druhů (všechny?) mají i tzv. časné spory, které slouží k šíření uvnitř hostitele. Ultrastrukturální studie jsou známé pro mnoho druhů, vykazují ale velice málo druhově specifických znaků (Maddox a kol., 1999; Canning a kol., 1999b)

*Larssoniella resinellae* Weiser, 1997 je jediný dosud popsaný druh tohoto rodu z Lepidopter, z *Petrova resinella*, čeledi Tortricidae. Napadá většinu orgánů hostitele a je přenosný perorálně i transovariálně. Merogonie i sporogonie je přímém kontaktu s cytoplasmou hostitelské buňky, jádra jsou celý vývojový cyklus izolovaná. Jednojaderné dlouze oválné až tyčinkovité spory vykazují málo specifických znaků. Vývojový cyklus a ultrastruktura jsou dokumentovány jen z části (Weiser, 1997).

*Orthosomella operophtherae* (Canning, 1960) Canning, Wigley a Barker, 1991 (původně *Nosema o.*, později s neplatným jménem *Orthosoma o.* Canning, Wigley & Barker, 1983) z *Operophtera brumata* (čel. Geometridae) napadá všechny orgány hostitele a je přenosná perorálně i transovariálně. Celý vývojový cyklus v přímém kontaktu s cytoplasmou hostitelské buňky, a izolovanými jádry. Kulovitá merogoniální plazmodia se dělí binárním dělením a plazmotomií, řetízkovitá sporogoniální se 4, 8, až 12 jádry nejdříve na dvoujaderné segmenty, ze kterých



vznikají 1 jaderné sporoblasty a elipsoidní spory variabilní velikosti. Ultrastruktura spor nevykazuje výraznější znaky, např. ve srovnání s druhy rodu *Nosema*.

*O. operophterae* se vyskytuje ve smíšených infekcích s druhy *Cystosporogenes operophterae* (Canning, 1960) a *Nosema wistmansi* Canning, Wigley & Barker, 1983 (Canning a kol., 1985). Podle lokalizace infekce a morfologie spor může *Nosema wistmansi* představovat časné spory jednoho ze zbylých druhů a životní cyklus by mohl být složitější, s diplokaryotickou fází (Canning, personal communication 2005; druhy jsou časté i v ČR – viz. kap. 5.)

Druhy rodu *Endoreticulatus* jsou popsány kromě motýlů (Lepidoptera) i z brouků (Coleoptera) a recentně i z některých korýších skupin: žábronožek (Crustacea, Anostraca) (Martinez a kol., 1993) a krabů (Crustacea, Decapoda) (Wang a Chen, 2007), druhy rodu *Cystosporogenes* kromě motýlů (Lepidoptera) i z blanokřídlých (Hymenoptera) a dvoukřídlých (Diptera); hostitelský okruh druhů rodu *Vavraia*, *Gurleya* a *Thelohania* byl uveden v předchozí kapitole; rod *Vairimorpha* je popsán kromě motýlů (Lepidoptera) a blanokřídlých (Hymenoptera) recentně i z dekapodních korýšů (Decapoda : Parastacidae) (Moodie a kol., 2003b); rod *Nosema* má zástupce dokumentovány snad ze všech skupin živočichů (Sprague, 1977, Larsson, 1999) včetně raritních jako (Myxosporea, Digenea, Mollusca, Bryozoa) je v korýších (Crustacea) i obratlovcích (Vertebrata) těžiště má v hmyzu (Insecta), a z něj nejvíce druhů je popsáno z motýlů (Lepidoptera); podobně jako u rodu *Thelohania* z předcházející kapitoly mnoho zástupců rodu *Nosema* již bylo překlasifikováno do jiných rodů viz. kap. 2.3.2.

Rody *Orthosomella* a *Larssoniella* jsou popsány jen z motýlů (Lepidoptera) a brouků (Coleoptera) (Canning a kol., 1991; Andreadis a kol., 1996; Weiser, 1997, 2006).

Ekologické charakteristiky jako kompletní životní cyklus, způsob přenosu či hostitelská specifita jsou u většiny druhů mikrosporidií z motýlů dobře známé. Výjimku tvoří samostatní zástupci rodů *Vavraia*, *Gurleya*, částečně *Larssoniella* a oktosporoblastická sekvence druhů rodu *Vairimorpha*.

## 2.3 Fylogenetické vztahy (uvnitř skupiny)

### 2.3.1 Metodická východiska

Fylogenetické vztahy mikrosporidií zkoumala do současnosti řada studií s použitím různých metodik i typů fylogenetických analýz. Naprostou většinu z nich tvoří jednolokusové analýzy genu pro ssu rRNA (malou podjednotku ribozomální RNA = 16S), pro kterou je v databázích Genových Bank největší počet dostupných sekvencí (více než 200 pro popsané druhy), část studií zahrnuje i ITS (mezerník 1 = internal transcribed spacer 1) a část lsu rRNA (velkou podjednotku ribozomální RNA = 18S). Jedna studie je založena výhradně na úseku lsu rRNA (Baker a kol., 1994), několik na analýze genu pro lsu RNA Polymerázy II (RPB1) (Cheney a kol., 2001; Vávra a kol., 2006b; Ironside, 2007). Zbylé geny, jejichž výčet podávají např. Weiss a Vossbrinck (1999) se pro fylogenetické analýzy uvnitř skupiny ukázaly nevhodné (např. geny pro tubuliny pro jejich extrémní diverzitu) nebo byly použity pro jiné účely (fylogenetické vztahy mikrosporidií vůči jiným skupinám organismů) (kap.2.1). Analýzy genů pro ssu rRNA dávají dobré rozlišení na rodové úrovni a

úrovních vyšších taxonomických jednotek (skupiny, klady) (Baker a kol., 1995; Cheney a kol., 2000; Slamovits a kol., 2004; Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005), nicméně mají relativně málo informativních míst a jsou i jako „konzervativní geny“ mutačně nasycené (saturované) a nemusí vždy věrohodně zobrazovat fylogenezi (kladogenezi) (Moodie a kol., 2003; Brown a Adamson, 2006). Geny pro ITS, I5S rRNA a RPB1 poskytují více informativních míst a jsou proto vhodnější na detailnější rozlišení taxonů na rodové, druhové i nižších úrovních (Baker a kol., 1994; Canning a kol., 1999; Cheney a kol., 2001; Tsai a kol., 2003).

Striktní vymezení jednolokusových analýz u těchto genů je problematické, protože zatímco RPB1 se vyskytuje v genomu všech dosud zkoumaných mikrosporidií v 1 kopii, kopie ssu rRNA resp. tandemu ssu rRNA-ITS-I5S rRNA se u různých skupin mikrosporidií vyskytuje v různém počtu kopií (např. *Encephalitozoon cuniculi* 2x na každém z 11 chromosomů, *Nosema bombycis* pouze (1x) na jediném chromozomu) (Kawakami a kol., 1994; Katinka a kol., 2001). U některých druhů mikrosporidií rodů *Nosema* a *Glugoides* bylo objeveno dokonce různé uspořádání tandemu genů pro rRNA (separace na části či reverze celých úseků) (Huang a kol., 2004; Tsai a kol., 2005; Refardt, 2007). Srovnávání skutečně homologních sekvencí a zjišťování možného polymorfizmu je tak v počátcích, protože pro většinu sekvenovaných druhů mikrosporidií v databázích Genových Bank je známá jen jedna sekvence uvedených genů. Rovněž celý tandem rDNA genů umožňující rekonstrukci sekundární struktury celé oblasti (či podstatné části) a kvalitnější alignment i fylogenetickou analýzu je omezen v současnosti na několik málo druhů (Tsai a kol., 2005; databáze GenBank NCBI).

Mnoholokusové analýzy byly zatím využity především pro diagnostické účely a pro rozlišování taxonomických jednotek na úrovni druhu a níže (klony, izoláty). Jejich provedení předcházela vývoj dnes již desítek různě specifických primerů, od univerzálních, po rodově i druhově specifické (Weiss a Vossbrinck, 1999). Nejčastější oblastí studia byl úsek ITS, který byl vyžit v diagnostice savčích resp. lidských mikrosporidií a ukázal i široký polymorfizmus (Didier a kol., 1995, 1996; Hollister a kol., 1996; Rinder a kol., 1997; Mathis a kol., 1999; Haro a kol., 2003). Kromě naposled uvedených prací (u *E. cuniculi*, *E. bienensei*, *E. hellem*) a fylogeneticky příbuzné *Nucleospora salmonis* (Gresoviac a kol., 2000) byl rozsáhlý vnitrodruhový polymorfizmus ITS (i rDNA) popsán u celé řady dalších, především terestrických mikrosporidií: u komplexu *Thelohania solenopsae* (Moser a kol., 1998, 2000), druhů komplexu *Nosema/Vairimorpha* z *Lymantria dispar* (Maddox a kol., 1999), *N. apis* (Gatehouse a kol., 1998) a *N. bombi* (Tay a kol., 2005; O'Mahony a kol., 2007). Posledně jmenované práce odhalily rozsáhlý polymorfizmus rRNA genů u *N. bombi* parazitující různé druhy čmeláků (*Bombus* spp.) a dokonce i jejich jednotlivé varianty v rámci jediné spory. Tato zjištění, podobně jako nedávné odhalení retrotranspozonů (Xu a kol., 2006), které mohou hrát roli v reorganizaci genomu, otevírají novou kapitolu ve studiu populačních a fylogenetických vztahů (druhovost) u mikrosporidií bez detekované sexuální fáze.

Fingerprintingové a příbuzné techniky mnoholokusových analýz: RAPD (Mathis a kol., 1997; Tsai a kol., 2003; Rao a kol., 2007), RFLP (Leiro a kol., 2000), riboprinting (Pomport-Castillon a kol., 1997) nebo ISSR (Rao a kol., 2005) byly úspěšně použity pro identifikaci klonů/izolátů u různých druhů mikrosporidií i stanovení jejich bližších fylogenetických vztahů (Rao a kol., 2005). Podle počtu dosavadních publikací nenašly zatím ve studiu mikrosporidií tyto metody většího rozšíření, ale současný posun k poznávání vnitrodruhového polymorfizmu, kvalitnějšího rozlišení fylogenetických vztahů blízkých rodů (na něž nedostačují 1

lokusové analýzy) i ke studiu genetiky mikrosporidií naznačuje, že se budou užívat častěji.

Z hlediska vyhodnocení fylogenetických dat byly u výše i dále jmenovaných studií použity prakticky všechny známé typy fylogenetických analýz: distanční metody (nejčasteji neighbour-joining - Terry a kol., 1999; Bell a kol., 2001; Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005 a logDet/paralineární model vzdáleností - Refardt a kol., 2002; Nilsen a Chen, 2001), parsimonní analýzy (nejčasteji maximální parsimonie (m.max.úspornosti) – Moodie a kol., 2003; Vossbrinck a kol., 2004, metoda maximální pravděpodobnosti (Maximum likelihood, Swofford, 2002) – nejčastější a v současnosti standardní – Lom a Nilsen, 2003; Brown a Adamson, 2006 a Bayesovská analýza (posteriorních pravděpodobností) (Huelsenbeck a kol., 2001) – Canning a kol., 2002; Terry a kol., 2004.

### **2.3.2 Současný stav a diskrepance fylogeneze s taxonomií/klasifikací a hostitelskou příslušností**

Většina fylogenetických studií publikovaných do současnosti byla prováděna buď jako analýza mikrosporidií parazitujících vymezenou skupinu hostitelů, např. mikrosporidie ryb (Nilsen a kol., 1998; Nilsen, 2000; Lom a Nilsen, 2003; Bell a kol., 2001), komárů (Baker a kol., 1998; Vossbrinck a kol., 2004), motýlů (Malone a McIvor, 1996; Canning a kol., 1999; Canning a kol., 1999b; Tsai a kol., 2003), některých skupin korýšů (Refardt a kol., 2002; Terry a kol., 2004) nebo jako studie fylogenetických vztahů nově popisovaných taxonů (Moser a kol., 1998; Fries a kol., 1999; Terry a kol., 1999; Adler a kol., 2000; Cheney a kol., 2000; Mueller a kol., 2000; Nilsen a Chen, 2001; Lom a kol., 2001; Canning a kol., 2002; Sokolova a kol., 2003; Moodie a kol., 2003; Morris a kol., 2005; Sokolova a kol., 2006a,b; Vávra a kol., 2006a,b; Brown a Adamson, 2006). (Výčet není z praktických důvodů kompletní, vybrali jsme podle naší úvahy nejzásadnější práce z hlediska poznání fylogenetických vztahů mikrosporidií i klíčových taxonů).

Velké fylogenetické studie zahrnující všechny druhy do té doby sekvenovaných mikrosporidií jsou v současnosti omezené na jedinou publikaci (Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005). Existují i rozsáhlejší, ale již neúplné studie (Lom a Nilsen, 2003; Terry a kol., 2004; Slamovits a kol., 2004). Dvě nám známé práce analyzují primárně fylogenetické vztahy mezi rody mikrosporidií napříč hostitelskou příslušností (Baker a kol. 1994; Cheney a kol. 2001).

Výsledky těchto fylogenetických studií odhalily existenci několika velkých superkladů sdružujících příbuzné skupiny mikrosporidií. V závislosti na rozsahu studie i jejich vymezení se pohybují v počtu 5-8, mají nestejný počet zástupců a některé čítají jen několik druhů (Refardt a kol., 2002; Canning a kol., 2002; Lom a Nilsen, 2003; Terry a kol., 2004; Slamovits a kol., 2004; Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005). Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005 se pokusili definovat i vyšší fylogenetické taxony sdružující tyto superklady, analogické a pracovní nazývané třídami (Class Aquasporidia, Marinosporidia, Terresporidia) definované podle prostředí („habitatu“) ze kterého se vyvinuli jejich zástupci. Toto členění mikrosporidií na 3 bazální „megaskupiny“: 2 monofyletické Marinosporidia a Terresporidia a parafyletickou Aquasporidia se ale neseťkalo se všeobecným přijetím (Larsson, 2005), obsahuje řadu podivných výjimek (viz. dále), které se nepodařilo

přesvědčivě vysvětlit a některé recentní práce již ukazují, že jde o členění čistě umělé (Brown a Adamson, 2006).

Kromě existence hlavních skupin (superkladů) nemůžeme v současnosti s jistotou říci více (obecný závěr) o jejich topologii ani topologii jejich podskupin. Výše uvedené studie podávají příklady alternativních fylogenetických vztahů jednotlivých skupin s kladogenezemi původnějších a odvozených taxonů s různě vysokou bootstrapovou/resamplingovou podporou. Jejich výčet přesahuje objemově rámec této kapitoly – lze shrnout, že existují skupiny, které konstantně klastrují s vysokou bootstrapovou podporou a relativně konstantní topologií vůči jiným skupinám nezávisle na použité fylogenetické analýze a skupiny, jejichž umístění se výrazně mění jak s použitou fylogenetickou analýzou, tak substitučním modelem nukleotidových změn, tak velikostí zkoumaného vzorku. Topologii fylogenetických stromů nejvíce mění proměnné pozice některých problematických druhů resp. skupin s dlouhými větvemi. Klasickými příklady jsou *Flabelliforma magnivora*, *Antonospora scoticae* nebo *Thelohania contejeani*, jejich pozice se mění ve většině fylogenetických stromů výše uvedených studií (Slamovits a kol., 2004; Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005). Množství rozdílů (počet informativních míst) v sekvencích je odlišné i mezi velkými skupinami mikrosporidií („*Amblyospora* group“ vs. „fish infecting species“ (Nilsen a kol., 1998; Nilsen, 2000; Nilsen a Chen, 2001; Lom a Nilsen, 2003) nebo vs. „*Nosema/Vairimorpha* clade“ (Baker a kol. 1994; Moser a kol., 1998; Fries a kol., 1999); skupina mikrosporidií z mechovek spolu s příbuznými rody *Tubulinosema* a *Systemostrema* vs. ostatní klady (nízká similarita sekvencí s ostatními mikrosporidii) (Canning a kol., 2002; Sokolova a kol., 2006a). Všechny tyto příklady ukazují na nerovnoměrnou rychlost evoluce různých skupin mikrosporidií (Fries a kol., 1999; Nielsen a Chen, 2001; Lom a Nilsen, 2003), které ve fylogenetických analýzách v současnosti nemůžeme nepostihnout (neodhalíme věrný obraz kladogeneze) dokud nebudeme mít více molekulárních dat (delší sekvence). Ze stejných důvodů nelze s určitostí stanovit, která ze stávajících skupin je nejpůvodnější - na základě fylogenetických analýz bylo předloženo několik hypotéz z nichž nejčastější jsou 1) *Antonospora scoticae* (Nilsen a Chen, 2001; Lom a kol., 2001; Canning a kol., 2002; Moodie a kol., 2003; Brown a Adamson, 2006 aj.); 2) skupina mikrosporidií z mechovek (*Pseudonosema*, *Trichonosema*, *Bryonosema*) s rody *Janacekia* a *Bacillidium* z muchniček resp. oligochet (Terry a kol., 2004; Vossbrinck a kol., 2004; Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005); 3) „*Amblyospora* group“. Tato skupina je považována za nejpůvodnější i fylogenetických pracích popisujících *Antonospora scoticae* (Fries a kol., 1999), druhy rodu *Bacillidium* (Nilsen a kol., 1999; Morris a kol., 2005) a mikrosporidie muchniček (Adler a kol., 2000). Fylogenetické analýzy Slamovits a kol. (2004) ukázaly vedle „*Amblyospora* group“ na možnou nejpůvodnější mikrosporidii i na *Flabelliforma magnivora*, podobně jako Refardt a kol. (2002).

Zatímco v případě kladogeneze nemáme dostatek dat na její přesnější rekonstrukci, v případě „neorientovaných“ příbuzenských vztahů máme data statisticky průkaznější, protože většina mikrosporidií klastruje v nezávislých analýzách do konzistentních skupin s vysokými bootstrapy. Tyto příbuzenské vztahy odhalují několik zásadních skutečností:

Fylogenetické studie podaly důkazy o těsných koevolučních vztazích mezi různými skupinami mikrosporidií a hostitelskými skupinami ve kterých parazitují (Baker et al., 1998; Lom a Nilsen, 2003; Vossbrinck a kol., 2004; Bell a kol., 2001; Slamovits a kol., 2004; Terry a kol., 2004; Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005) - podle hostitelských skupin (nebo dominantních/centrálních rodů) se skupiny

(klady) mikrosporidií i pojmenovávají/definují („Fish group“; „Bryozoan-infecting group“; „Culex group“; „Amblyospora group“; „Nosema/Vairimorpha group“; „Pleistophora group“; „Enterocytozoon/Endoreticulatus group“).

Dalším zjištěným faktem je, že fylogenetické vztahy nekorespondují s morfologickými, ultrastrukturálními a vývojovými znaky na úrovni prakticky žádné z taxonomických jednotek (druhu, rodu i vyšších taxonů) (Baker et al., 1994, Baker et al., 1995, Weiss and Vossbrinck, 1999, Nilsen et al., 1998, Nilsen, 1999, Moodie et al., 2003, Bell et al., 2004, Vossbrinck and Debrunner-Vossbrinck, 2005, Brown and Adamson, 2006) - morfologicky definované rody a druhy se ve fylogenetických stromech objevují jako polyfyletické. Řada z nich byla již překlasifikována do nových rodů odpovídajících fylogenetickým vztahům a dohledány strukturální charakteristiky pro definici nového rodu (např. zástupci dřívějšího polyfyletického rodu *Nosema* - *Paranosema*, *Tubulinosema*, *Trichonosema*, *Bryonosema*, *Brachiola*, *Antonospora* (*locustae*), *Vittaforma*) (Canning a kol., 2002; Sokolova a kol., 2003; Cali a kol., 1998; Slamovits a kol., 2004; Silveira a Canning, 1995), některé druhy byly překlasifikovány provizorně (*Dictyocoela*) (Terry a kol., 2004) a mnoho druhů z polyfyletických rodů na překlasifikování čeká (*Amblyospora*, *Thelohania*, *Flabelliforma*, *Pleistophora*, *Vairimorpha* aj.).

Souběžně s touto diskrepancí mezi fylogenezí a „morfologickou klasifikací“ se objevily práce odhalující i (množící se) případy diskrepance mezi fylogenezí a dosavadní (a většinou platnou) korelací parazit-hostitelská skupina. Prvními příklady byly notoricky známé případy akvatické korýší mikrosporidie *Nosema granulosis* uvnitř terestrického motýlího kladu (Terry a kol., 1999), nebo terestrických *Vairimorpha* sp. a *Thelohania* sp. z mravenců (Moser a kol., 1998) či *Vavraia oncoeperae* z motýlů (Malone a kol., 1987) uvnitř různých akvatických kladů (Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005). Jejich vysvětlování přes laterální transfery není jednoduché a parsimonní a nebylo věrohodně interpretováno doposud (Lom a Nilsen, 2003; Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005; Larsson, 2005; Brown a Adamson, 2006). Recentní práce dále ukazují, že se nejedná o výjimky, ale tento fenomen je daleko rozšířenější a byl způsoben jen nedostatkem reprezentativních zástupců resp. převahou zástupců některých uniformních skupin (Voronin a Melnikova, 1984; Voronin, 1991; Langdon, 1991; Bronnvall a Larsson, 1994; Sene a kol., 1997; Azevedo, 2001; Weiser a kol., 2002; Canning a kol., 2002b; Lange a kol., 2006; Wang a Chen, 2007) (viz. kap. 6 diskuse). Posledním důležitým zjištěním fylogenetických vztahů v korelacích parazit-hostitelská skupina je mozaikovitá distribuce mikrosporidií parazitující různé taxonomické skupiny korýšů napříč hlavními klady fylogenetických stromů (Crustacea, Cladocera - Refardt a kol., 2002; Crustacea, Amphipoda - Terry a kol., 2004; Crustacea, Decapoda - Brown a Adamson, 2006).

### 3. CÍLE PRÁCE

Jak vyplývá z literárního přehledu, zatímco je evidované rodové a druhové spektrum mikrosporidií z Trichopter a Lepidopter relativně široké, znalosti o jejich biologii, životních cyklech resp. dílčích vývojových cyklech i charakterizace jednotlivých rodů a druhů, jejich jasné vymezení a fylogenetické vztahy, jsou velmi kusé nebo zcela chybí. Podobná situace je i v poznání fylogenetických vztahů uvnitř mikrosporidií obecně, zatímco jsou známe (a dobře podpořené) fylogenetické vztahy některých skupin, většina popsanych rodů není dosud molekulárně biologicky charakterizována (osekvenována), nejsou známy jejich skutečné fylogenetické vztahy a současně rody a druhy nově charakterizované narušují zásadně dřívější fylogenetické i klasifikační představy a prohlubují rozpory mezi fylogenezí vs. taxonomií a klasifikací, ale i fylogenezí vs. hostitelskou příslušností, která se zdála podle prvotních studií jednoduše korelovat. Většina dřívějších strukturálně definovaných a bazálních rodů mikrosporidií jako *Nosema*, *Thelohania*, *Amblyospora* se objevuje ve fylogenetických studiích jako polyfyletické taxony napříč hlavními klady definovanými fylogenetickými studiiemi spolu s hostitelskou příslušností. Řada z nich byla a je recentně překlasifikována, nicméně nebylo dosud publikováno věrohodné vysvětlení tohoto fenomenu. Modelová skupina mikrosporidií z Trichopter a Lepidopter se pro objasnění těchto otázek výjimečně hodí, protože zahrnuje druhy které vlastní prakticky celý komplex „klasických biologických znaků“- strukturálních i ekologických, používaných v klasifikaci a charakterizaci mikrosporidií. Zároveň se jedná o fylogeneticky velice příbuzné skupiny hostitelů vyskytující se v rozdílných ekologických nikách, což umožňuje odvodit zákonitosti evoluční historie jejich parazitů a jejich vývojových cyklů.

Konkrétní cíle práce byly následující :

- Zjistit rodové a druhové spektrum mikrosporidií z Trichopter a Lepidopter, jejich prevalenci a hostitelskou specificitu.
- Charakterizovat sebrané izoláty na základě strukturálních znaků: vývojových cyklů, morfologie a ultrastruktury vývojových stádií a spor a molekulárně taxonomických znaků: úseků genů pro ssu rRNA, ITS a lsu rRNA.
- Stanovit validitu a fylogenetické vztahy uvedených taxonomických jednotek (druhů a rodů) na základě fylogenetických analýz a srovnáním se strukturálními a ekologickými daty. Do srovnávací analýzy zahrnout i úseky ITS/lsu rRNA získané z DNA některých typových a obtížně dostupných druhů.
- Provést komparativní analýzu strukturálních a ekologických dat s výsledky fylogenetických analýz.

### **3.1 Metodiky**

Metodiky použité k získání několika typů biologických dat: ekologických, strukturálních a molekulárně taxonomických jsou podrobně specifikovány v příslušných kapitolách přiložených publikací. Souhrnně se jednalo o zmapování (screening) parazitofauny Trichopter a Lepidopter na území ČR, Slovenska a Bulharska, přímé a nepřímé zjištění jejich hostitelské specificity - laboratorní a semilaboratorní infekční pokusy, charakterizace izolátů světelnou, skenovací a transmisní elektronovou mikroskopií, izolace DNA z živých spor a z typových a sbírkových preparátů a sekvenace vybraných úseků rDNA (geny pro ssu rRNA, ITS a lsu rRNA) s následnými fylogenetickými analýzami.

## 4. PUBLIKACE

Shrnující článek týkající se tématu disertační práce (draft připravený k publikaci):

1/ **Hyliš M.**, Oborník M., Vávra J. XXXX. *Zelenkaia trichopterae* gen. et sp. nov. (Microspora, Fungi), an Aquatic Disporoblastic Microsporidian Parasite of Caddis Flies (Trichoptera, Insecta).

Publikované články k tématu disertační práce:

2/ **Hyliš M.**, Oborník M., Nebesářová J., Vávra J. 2007. Aquatic tetrasporoblastic microsporidia from caddis flies (Insecta, Trichoptera): Characterisation, phylogeny and taxonomic reevaluation of the genera *Episeptum* Larsson, 1986, *Pyrotheca* Hesse, 1935 and *Cougourdella* Hesse, 1935. *Eur. J. Protistol.* 43 (3): 205-224.

3/ **Hyliš M.**, Pilarska D. K., Oborník M., Vávra J., Solter L. F., Weiser J., Linde A., and McManus, M. L. 2006. *Nosema chrysorrhoeae* n. sp. (Microsporidia), isolated from browntail moth (*Euproctis chrysorrhoea* L.) (Lepidoptera, Lymantriidae) in Bulgaria: Characterization and phylogenetic relationships. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 105-114.

4/ Vávra J., **Hyliš M.**, Vossbrinck C.R., Pilarska D.K., Linde A., Weiser J., McManus M.L., Hoch G., Solter L.F. 2006. *Vairimorpha disparis* n. comb. (Microsporidia: Burenellidae): A redescription and taxonomic revision of *Thelohania disparis* Timofejeva 1956, a microsporidian parasite of the gypsy moth *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (4): 292-304.

Publikované články související s tématem disertační práce:

5/ Vávra J., **Hyliš M.**, Oborník M., Vossbrinck C. R., 2005. Microsporidia in aquatic microcrustacea: the copepod microsporidium *Marssoniella elegans* Lemmermann, 1900 revisited. *Folia Parasitologica* 52 (1-2), 163-172.

6/ **Hyliš M.**, Weiser J., Oborník M., Vávra J., 2005. DNA isolation from museum and type collection slides of microsporidia. *J. Invertebr. Pathol.* 88, 257-260.

Abstrakty týkající se tématu disertační práce:

7/ Solter L., D'Amico V., Goertz D., Hoch G., **Hyliš M.**, Linde A., McManus M., Novotný J., Pilarska D, Solter P., Vávra J., Weiser J. and Zubrik M. 2004. Research on microsporidia as potential classical and augmentative biological control agents of the gypsy moth. Proceedings, XV USDA Interagency Research Forum on Gypsy Moth and Other Invasive Species 2004. Book of Abstracts.

8/ **Hyliš M.**, Oborník M., Vávra J., 2004. Trichopteran microsporidia: characterisation, variability and discrepancy between phylogeny and classification. NATO Advanced Research Workshop "Emergent Pathogens in the 21st Century: First United Workshop on Microsporidia from Invertebrate and Vertebrate Hosts", České Budějovice, Czech Republic, July 12-15, 2004. Book of Abstracts.



**4.1 Hyliš M., Oborník M., Vávra J. XXXX. *Zelenkaia trichopterae* gen. et sp. nov. (Microspora, Fungi), an Aquatic Disporoblastic Microsporidian Parasite of Caddis Flies (Trichoptera, Insecta). (draft připravený k publikaci)**

**4.2 Hyliš M., Oborník M., Nebesářová J., Vávra J. 2007. Aquatic tetrasporoblastic microsporidia from caddis flies (Insecta, Trichoptera): Characterisation, phylogeny and taxonomic reevaluation of the genera *Episeptum* Larsson, 1986, *Pyrotheca* Hesse, 1935 and *Cougourdella* Hesse, 1935. *Eur. J. Protistol.* 43 (3): 205-224.**

**4.3 Hyliš M., Pilarska D. K., Oborník M., Vávra J., Solter L. F., Weiser J., Linde A., and McManus, M. L. 2006. *Nosema chrysorrhoeae* n. sp. (Microsporidia), isolated from browntail moth (*Euproctis chrysorrhoea* L.) (Lepidoptera, Lymantriidae) in Bulgaria: Characterization and phylogenetic relationships. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 105-114.**

**4.4 Vávra J., Hyliš M., Vossbrinck C.R., Pilarska D.K., Linde A., Weiser J., McManus M.L., Hoch G., Solter L.F. 2006. *Vairimorpha disparis* n. comb. (Microsporidia: Burenellidae): A redescription and taxonomic revision of *Thelohania disparis* Timofejeva 1956, a microsporidian parasite of the gypsy moth *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (4): 292-304.**

**4.5 Vávra J., Hylíš M., Oborník M., Vossbrinck C. R., 2005. Microsporidia in aquatic microcrustacea: the copepod microsporidium *Marssoniella elegans* Lemmermann, 1900 revisited. *Folia Parasitologica* 52 (1-2), 163-172.**

**4.6 Hyliš M., Weiser J., Oborník M., Vávra J., 2005. DNA isolation from museum and type collection slides of microsporidia. *J. Invertebr. Pathol.* 88, 257-260.**

## **4.7 Abstrakty**

**4.7.1 Solter L., D'Amico V., Goertz D., Hoch G., Hyliš M., Linde A., McManus M., Novotný J., Pilarska D, Solter P., Vávra J., Weiser J. and Zubrik M. 2004. Research on microsporidia as potential classical and augmentative biological control agents of the gypsy moth. Proceedings, XV USDA Interagency Research Forum on Gypsy Moth and Other Invasive Species 2004. Book of Abstracts.**

**4.7.2 Hyliš M., Oborník M., Vávra J., 2004. Trichopteran microsporidia: characterisation, variability and discrepancy between phylogeny and classification. NATO Advanced Research Workshop "Emergent Pathogens in the 21st Century: First United Workshop on Microsporidia from Invertebrate and Vertebrate Hosts", České Budějovice, Czech Republic, July 12-15, 2004. Book of Abstracts.**

## 5. SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky lze shrnout do následujících 4 bodů:

- 1) screeningová a experimentální data týkající se prevalence, druhové a rodové diversity, hostitelské a tkáňové specifity resp. ekologických a patofyziologických charakteristik infekcí a přenosu.
- 2) taxonomicko-klasifikační studie
- 3) sekvenační výstupy a fylogenetické analýzy
- 4) závěry komparativní studie (sloučená data) a modelové hypotézy – tyto výsledky mají z části pravděpodobnostní charakter a jsou proto shrnuty v závěrečné kapitole diskuse (kap.6)

Ad 1)

V rámci screeningu bylo izolováno 24 mikrosporidií z Trichopter a Lepidopter a 5 z potenciálních mezihostitelů (Crustacea, Amphipoda) řazených podle konvenční klasifikace (Canning a Vávra, 2000) do následujících rodů: *Nosema* (7), *Endoreticulatus* (3), *Cystosporogenes* (2), *Thelohania* (4), *Gurleya* (1), *Cougourdella* (1), *Pyrotheca* (1), *Episeptum* (5), *Toxoglugea* (1), *Larssoniella* (2), neurčené izoláty (2)

Předkládané publikace (1-3) a abstrakt (8) podávají ekologická a experimentální data o prevalenci, hostitelské a tkáňové specifitě a přenosu 10 z nich. Publikace (4) a abstrakt (7) podávají ekologická a experimentální data několika izolátů z *Lymantria dispar* (Lepidoptera) na jejichž získání jsme se spolupodíleli.

Shrnutí: Všechny studované druhy mikrosporidií z Trichopter řazené do rodů *Episeptum*, *Paraepiseptum* n. g., *Zelenkaia* n. g. jsou druhově specifictí parazité, napadají tukové těleso a oenocyty a jejich spory nejsou infekční/přenosné na původní hostitele, jejich životní cyklus zahrnuje pravděpodobně mezihostitele a (nebo) transovariální přenos. Sekvenční data rDNA mikrosporidií řazených provizorně do rodů *Thelohania*, *Gurleya*, *Toxoglugea* (unpublished) z několika druhů *Gammarus* sp. které se vyskytovaly na stejných lokalitách s infikovanými chrostíky vyvrátila možnost, že by tyto mikrosporidie resp. hostitelé byly zahrnuty v životních cyklech skupiny mikrosporidií z Trichopter. Fylogenetická blízkost druhů rodu *Paraepiseptum* s copepodní mikrosporidií *Marssoniella elegans* naopak naznačuje že by potenciálními mezihostiteli mohly být korýši skupiny Copepoda.

Studované druhy mikrosporidií z Lepidopter řazené do rodů *Nosema* a *Vairimorpha* jsou horizontálně i vertikálně (per os a transovariálně) přenosné mikrosporidie. Druhy rodu *Nosema* jsou vysoce druhově specifické mikrosporidie a přes uvedený transovariální přenos infikující preferenčně (dominantně) různé typy tkání (slinné a snovací žlázy nebo tukové těleso). Studované izoláty druhu *Vairimorpha disparis* n. comb. nejsou hostitelsky specifické, napadají široké spektrum příbuzných i nepříbuzných druhů Lepidopter, část vývojového cyklu produkujícího 1 jaderné meiospory (oktopory) je vázaná výlučně na tukové těleso.



Ad 2)

Publikace (1) popisuje nový rod disporoblastické mikrosporidie z Trichopter s typovým druhem *Zelenkaia trichopterae* gen. et sp. nov.; publikace (2) popisuje 4 nové druhy tetrasporoblastických mikrosporidií z Trichopter (*Episeptum trichoinvadens* n. sp., *E. pseudoinversum* n. sp., *E. anaboliae* n. sp. a *Paraepiseptum plectrocnemiae* n. sp.), redefinuje stávající rod *Episeptum* a přesouvá druhy z Trichopter klasifikované do rodů *Cougourdella* a *Pyrotheca* do nově vytvořeného *Paraepiseptum* gen. nov.; publikace (3) popisuje nový druh mikrosporidie z Lepidopter *Nosema chrysorrhoeae* n. sp. a molekulárně taxonomicky charakterizuje některé blízké příbuzné druhy rodu *Nosema*; publikace (4) taxonomicky reviduje druh *Thelohania disparis* Timofejeva 1956 a redeskribuje ho pod jiný rod jako *Vairimorpha disparis* n. comb. (mikrosporidie Lepidopter); publikace (5) reviduje druh *Marssoniella elegans* Lemmermann, 1900, mikrosporidii z *Cyclops vicinus* (Crustacea, Copepoda), blízké příbuzný druh tetrasporoblastickým mikrosporidiím Trichopter rodu *Paraepiseptum* gen. nov.

Ad 3)

V rámci publikací (1-3) resp. (5) bylo do databáze Genové Banky uvolněno 23 původních sekvencí parciálních úseků genu pro ssu rRNA resp. ITS a lsu rRNA izolovaných ze živých spor charakterizovaných druhů a ze syntypových a sbírkových preparátů (publikace 6). V rámci této práce a prezentace (abstraktu 8) byli zveřejněny i výsledky fylogenetických analýz z dosud neuvolněných sekvencí mikrosporidií z Trichopter rodů *Issia* a *Amblyospora* (popsaná jako *Thelohania*) (nerevidované typové druhy s neúplnou charakterizací)

Shrnutí fylogenetických analýz publikací (1-5) a prezentace (abstrakt 8):

Mikrosporidie z Trichopter zahrnující rody *Episeptum*, *Paraepiseptum*, *Zelenkaia*, *Issia* a *Amblyospora* (*Thelohania*) tvoří několik samostatných skupin uvnitř velkého kladu sdružujícího mikrosporidie některých skupin korýšů (především Copepoda a Cladocera) a některých skupin hmyzu s larválním vývojem ve vodě (Diptera - Culicidae, Simuliidae). Tento kladus je sesterskou skupinou dobře definovaného kladu sdružujícího mikrosporidie komárů (některé s mezihostitelskými kopepodními korýši) kolem centrálního rodu *Amblyospora* („Amblyospora group species“ sensu Baker et al., 1998). Jednu skupinu tvoří fylogeneticky blízké příbuzné druhy tetrasporoblastických rodů *Episeptum* a *Paraepiseptum* společně s kopepodní mikrosporidií *Marssoniella elegans*. Tato skupina je fylogeneticky příbuzná skupině morfologicky výrazně odlišných druhů disporoblastických mikrosporidií rodu *Zelenkaia*. Zástupci rodů *Issia* a *Amblyospora* (*Thelohania*) z Trichopter jsou nejbližší příbuzné skupině druhů rodu *Parathelohania*.

Charakterizované druhy rodu *Nosema* a *Vairimorpha* z Lepidopter tvoří fylogeneticky velmi blízké příbuznou skupinu parazitů čeledi Lymantriidae (Lepidoptera) uvnitř skupiny mikrosporidií z hymenopter (druhy *N. ceranae*, *N. apis*, *N. bombi*) a některých dalších mikrosporidií terestrických skupin hmyzu. Celý kladus je sesterskou skupinou kladu tvořeného druhy mikrosporidií z Lepidopter kolem centrálního druhu *N. bombycis* a druhy rodu *Nosema* a *Vairimorpha* z amfipodních a dekapodních korýšů. Fylogenetické vzdálenosti mezi charakterizovanými druhy rodu *Nosema* navzájem (i vůči druhům rodu *Vairimorpha*) jsou výrazně menší než vzdálenosti mezi druhy jednotlivých rodů z Trichopter. Striktní hostitelská specifita druhů rodu *Nosema* z čeledi Lymantriidae však naznačuje že jde o (dobré) validní druhy.

## 6. ZÁVĚR - DISKUSE

Základní dvě otázky týkající se současných znalostí fylogenetických vztahů uvnitř mikrosporidií jsou:

1. nakolik spolehlivě jsou fylogenetické analýzy schopny zachytit příbuzenské vztahy jednotlivých taxonů a rekonstruovat fylogenezi a

2. jak interpretovat fylogenetické vztahy které jsou v rozporu s taxonomií a klasifikací a hostitelskou příslušností resp. dřívějšími představami o biologii a ekologii mikrosporidií.

Jak ukazují univerzální teoretické modely i empirická data, je z hlediska věrohodnosti modelované fylogeneze (z konzervativních genů) zdaleka nejdůležitější nikoli použitý typ analýzy jako délka sekvence: u 10 analyzovaných OTU (taxonomických jednotek) je 50% správných fylogenetických stromů získáváno při délce sekvencí až kolem 2000bp, 80% až kolem délky 5000bp, nezávisle na použitém typu fylogenetické analýzy (Cummings a kol., 1995; Graur a Li, 1999). U mikrosporidií a jejich nejanalyzovanějšího genu pro ssu rRNA i s přilehlým ITS a částí lsu rRNA dostáváme úsek kolem 1500bp, který se u mnoha druhů vyskytuje navíc v paralogních kopiích v rámci 1 „individua“ i „populace“ 1 druhu. V případě 1 kopiového úseku genu pro RPB 1 (region A-G) sekvence varírují kolem délky 3000bp. Celý tento úsek je ale znám jen pro 11 mikrosporidií, což je příliš málo na vytváření velkých fylogenetických závěrů (Cheney a kol. 2001). V praxi tak existuje problém s nedostatkem dat - signálů pro rozlišení hlubšího větvení velkých skupin (kladogeneze) i pro průkazné rozlišení na úrovni rodu a druhu (jejich skutečná šíře) (Brown a Adamson, 2006; Vossbrinck a kol., 2004; Lom a Nilsen, 2003; Cheney a kol. 2001; Canning a kol., 2002; Baker a kol. 1994).

Interpretací fylogenetických vztahů i jejich rozporem s taxonomií/klasifikací a hostitelskou příslušností se zabývala řada autorů.

Cheney a kol. (2001) vyjadřují na základě molekulárních dat z RPB1 hypotézu o rychlé počáteční diverzifikaci předků mikrosporidií, kterou následovala pomalejší perioda evoluce do jejich současných forem. Tito předci nemuseli vypadat tak jako mikrosporidie dnešních bazálních skupin, u kterých navíc neznáme celý životní cyklus. Baker a kol. (1997, 1998) následovaný Vossbrinck a kol. (2004) a Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck (2005) soudí, že ancestrální mikrosporidie byly akvatické a měly komplexní životní cyklus až se 3 hostiteli; ze zjištěných dat vyvozují že evoluce této skupiny („Amblyospora group“) probíhala ve smyslu zjednodušování životních cyklů a zmenšování počtu stádií i hostitelů. Z dlouhé periody anageneze vysvětlují velké genetické rozdíly mezi druhy několika rodů kladu „Amblyospora group“ i jejich vysokou hostitelskou specifitu. To se zdá pravdivé, ale až od určitého okamžiku evolučního vývoje – jak oponují Nilsen (1999, 2001) nebo Larsson (2005) je málo pravděpodobné předpokládat, že komplexní životní cyklus se 3 hostiteli je ancestrální, „dlouhá větev vedoucí ke skupině „*Amblyospora*“ naznačuje dlouhou existenci této linie, ne ale nutně ve formě jakou známe dnes“. Jestli tato skupina (a její sesterská – aquatic group) mají hostitele ze skupiny Dipter – komárů a korýšů ze skupiny Copepoda, nabízí se nám jednoduchá úvaha, že v korýších byl předek dříve. Také předci dalších bazálních skupin mikrosporidií mohly vycházet z jiných hostitelů a nabývat jiných forem po dlouhou dobu své evoluce, jak naznačuje Nilsen (1999) v případě *Bacillidia* sp.. Morris a kol. (2005) popisují u *Bacillidium vesiculoformis* nemožnost přímého horizontálního přenosu na původního hostitele, ale i na předpokládané alternativní (mezi)hostitele

ze skupiny mechovek, které mají fylogeneticky blízké druhy mikrosporidií. Jediným pozitivním nálezem byli nálevníci, kteří podle autorů mohou fungovat jako parateničtí hostitelé nebo v prosté disperzi spor. V této skupině příbuzných mikrosporidií (mikrosporidie mechovek, *Bacillidium*) se nachází i mikrosporidie muchniček – rod *Janacekia*, který z těchto hostitelů a mikrosporidiálních forem byl původnější je velký otazník.

Kompletní životní cyklus a přímý přenos je znám jen u zlomku popsaných mikrosporidií, Vávra (1964b), Green (1974), Refardt a kol. (2002), Vávra (2005) dokumentují mikrosporidie z korýších skupin, které mají „neautoinfekční“ spory, Larsson (2005) předpokládá komplexnější životní cyklus pro další mikrosporidie (*Larssonia obtusa*, *Berwaldia schaefernai*, *Trichotuzetia guttata*) z „akvatického kladu“ (kladu sesterského kladu „Amblyospora“). Do této skupiny patří i námi charakterizované mikrosporidie z Trichopter, rovněž s autoneinfekčními sporami.

Předpoklad mezihostitele se ale netýká jen 3 dosud uvedených kladů mikrosporidií (Bryozoa infecting group, *Amblyospora* group, aquatic group), ale naprosté většiny z nich. Lom a Nilsen (2003) v rozsáhlé komparativní studii shrnují situaci ve velké skupině rybích mikrosporidií se závěrem, že existuje jen málo zpráv o úspěšném přímém přenosu a že transovariální přenos nebyl bezpečně dokázán (podobně jako nebyli dokumentováni mezihostitelé). Uvedení autoři současně připouští (z více důvodů očekávaný) společný původ mikrosporidií z ryb a korýších mikrosporidií, jak naznačuje umístění (*Tuzetia weidneri* (= *Pleistophora* sp. PA) uvnitř rybiho kladu a *Ameson michaelis* a *Perezia nelsoni* (= *Pleistophora* sp. PA) v pozici bazální sesterské skupiny. Pozici *Vavraia culicis*, *V. oncoperae* a *Trachipleistophora hominis* vysvětlují pravděpodobným přeskokem z původních rybích hostitelů, podobně jako pozici (přeskok) mikrosporidií parazitických myxosporidií (*Microsporidium* sp. MYX 1).

Jak jsme již zmínili v kap. 2.3.2. existují a množí se evidence takových „přeskoků“ uvnitř skupin, ve kterých bychom to nečekali a o kterých se soudilo že obsahují rody mikrosporidií specifické jen pro konkrétní skupinu hostitelů. *Vavraia* popsaná z komárů a později i flebotomů a chrostíků je hlášena i z korýšů – dekapodních (Azevedo, 2001; Langdon, 1991) a původnějších ostrakodů (Voronin a Melnikova, 1984). *Flabelliforma* popsaná původně rovněž z flebotomů byla později naleza v korýších – dafniích (Refardt a kol., 2002) a ostrakodech (Bronnvall a Larsson, 1994). Původně savčí *Encephalitozoon* je recentně reportován ze sarančí/kobylek (Lange a kol, 2006) i z korýšů – ostrakodů (Voronin, 1991). I terestrický „hmyzí“ *Endoreticulatus* je recentně hlášen dekapodních korýšů (Wang a Chen, 2007) a primitivních žábřonožek (Martinez a kol., 1993). Rody s velmi širokým spektrem hostitelských skupin nám mohou napovědět i pravděpodobný směr jakým se jejich předci šířili a ekologické pozadí procesu: rod *Unikaryon* s typovým druhem *Unikaryon piriformis* Canning, Lai and Lie, 1974 byl popsán z trematodní larvy (Digenea, Echinostomatidae) z *Lymnea rubiginosa* (Pulmonata, Lymnaeidae), pozdější popis (Azevedo and Canning, 1987) je založen na *U. legeri* (Dollfus, 1912) Canning and Nicholas, 1974 z metacerkárií *Meigymnophallus minutus* (Trematoda, Gymnocephalidae). Nejméně 13 druhů, většinou apansporblastických (*U. legeri* je disporblastický druh ve SPOV) je popsáno z platyhelmtu (cestodů a trematodů), brouků (Weiser a kol., 2002), roztočů, a korýšů – jeden *Unikaryon mytilicolae* Durfort, Vallmitjana a Vivares, 1980, i z kopepodního korýše. Jedná se evidentně o asambláž více rodů, rod *Oligosporidium* (dříve *U. arachnicolum*) již byl vyčleněn.

Uvedené příklady nejsou výjimky, podíváme-li se do literatury, najdeme jen velmi málo rodů které by neměly nějakého korýšního hostitele, na druhou stranu mikrosporidie korýšů (a původnější skupiny mikrokrustaceí zvláště) jsou jednou z nejpočetnějších i strukturálně nejdiverzifikovanějších skupin mikrosporidií (Sprague, 1977; Larsson a kol., 1996; Larsson, 1997; Bronnvall a Larsson 2001). Neexistuje jiné, pravděpodobnější vysvětlení, než že přeskoky probíhaly ve směru od korýšů na jiné hostitelské skupiny, jinými slovy ze skupin korýšů jejich mikrosporidiální předci radiovali. Ačkoli je rozvinutá hypotéza ještě více spekulativní, lze odvodit, že i kladogeneze předků korýších mikrosporidií (a dnešních kladů mikrosporidií) není náhodná, ale že v základních rysech kopíruje kladogenezi korýších taxonů. Ve velkém kladu *Amblyospora* group/aquatic group totiž dominují zástupci mikrosporidií z původnějších skupin (Phyllopoda – Copepoda, Cladocera; lze je rozčlenit i v rámci podskupin), zatímco jiné klady obsahují dominantní zástupce amfipodních korýšů, nebo dekapodních korýšů. Podobně jako amfipodní a dekapodní korýši jsou odvození z původnějších skupin korýšů, vše nasvědčuje tomu, že i skupiny terestrických či rybích mikrosporidií jsou odvozenější od původnějších mikrosporidií kladu *Amblyospora* group/aquatic group. Jinými slovy korelace parazit-hostitelských vztahů známá jako Farenholzovo pravidlo (kopírování kladogenezi) podporuje výsledky fylogenetických analýz, že *Amblyospora* group/aquatic group je (v současnosti známá) nejpůvodnější skupina mikrosporidií, tvořící „morfo genetický základ“ známých mikrosporidií. Pod tímto pohledem se jeví i řada obskurních mikrosporidií, primitivních hostitelských skupin, často hyperparazitů (Mezozoí, Platyhelminťů, Myxozoí nebo Ciliát) jako odvozené a nikoli původní mikrosporidie. Do této kategorie spadají i mikrosporidie skupiny Metchnikovellidae, považované vůbec za nejpůvodnější. Ty ale mohou být stejně tak původní jako (podle našeho názoru pravděpodobněji) odvozené.

Přeskoky a získání či ztráta nových (mezi)hostitelů byly logicky výhodné adaptace, které sebou nutně nesly řadu vedlejších ekologických a biologických fenoménů. K nejzásadnějším patří domnělá či skutečná ztráta sexuality. Práci analyzující 10 mikrosporidií dominantně terestrického kladu *Nosema/Vairimorpha* prezentoval v nedávné době Ironside (2007). Autor vyvozuje závěr o vícenásobných nezávislých ztrátách sexuality v uvedené skupině mikrosporidií bez evidence původních asexuálních linií. Přes jiné důležité poznatky, týkající se určitého zkrácení fylogeneze této skupiny (rychle se vyvíjejících druhů) na základě analýz ssu rDNA, kdy fixace alel 1 kopie tohoto genu může předcházet speciaci/odštěpení druhu, jakou lépe postihne fylogenetická analýza na základě RPB1, je konečný závěr postaven na nesprávných předpokladech a vývody nemusejí být pravdivé. Autor provedl testy věrohodnosti rozdílných topologií (AU test a WSH – vážený Shimodaira-Hasegawa test) na fylogenetických stromech kladu *Nosema/Vairimorpha* s vynucenou topologií podle 3 hypotéz. První hypotéza, že hmyzí zástupci kladu *Nosema/Vairimorpha* tvoří monofyletickou skupinu byla ale již dávno vyvrácena v několika studiích (Moodie a kol., 2003; Vossbrinck a Debrunner-Vossbrinck, 2005); druhá hypotéza byla v základu zavádějící, s předpokladem asexualy druhů rodu *Nosema*, ve skutečnosti testoval monofylii rodu *Nosema*, která byla také dříve vyvrácena v práci Baker a kol. (1994) o vztahu druhů mezi rody *Nosema* a *Vairimorpha* a třetí hypotézou testoval jen malý vzorek protože atypické uspořádání tandemu genů pro rRNA existuje i u jiných skupin mikrosporidií než z *Nosema/Vairimorpha* kladu (Refardt, 2007).

Naopak koncepce původních korýších hostitelů nabízí jiné vysvětlení: existenci asexuálních i sexuálních částí životního (vývojových) cyklu v rámci jednoho dimorfního druhu. Tento výklad vysvětluje i diskrepanci strukturálních (taxonomických) znaků jaká vychází z fylogenetických analýz. Jestliže měl hypotetický *Thelohania*-like předek této skupiny (a pravděpodobně i jiných skupin – Lom a kol., 2001; Lom a Nilsen, 2003; Moodie a kol., 2003, b,c; Brown a Adamson, 2006), diplokaryotickou i monokaryotickou fází, se SPOV i bez něj, jsou tyto (pleziomorfní) znaky nutně rozptýleny v celé skupině odvozených druhů jak poznáváme z fylogenetických stromů. Sexuální a asexuální linie tak koexistovali a pravděpodobně koexistují vedle sebe u různých druhů do současnosti v rodech *Nosema* a *Vairimorpha* ale i rodech které zůstali vázaní na korýše – Dictyocoela (dřívější komplex kolem *Thelohania muelleri*) (Terry a kol., 2004). A podobně pravděpodobně i u jiných druhů mikrosporidií.

Recentní nálezy retrotranspozonů resp. možných reorganizací genomu (Xu a kol., 2006) u této skupiny mikrosporidií (*Nosema bombycis*), stejně tak jako nápadně časté souběžné infekce „druhů“ rodu *Nosema* a *Vairimorpha* (v řadě Lepidopter – Weiser, 1961, 1966) i jejich polymorfismus resp. nepatrné rozdíly v sekvencích ssu rDNA (Maddox a kol., 1999; Vávra a kol., 2006a) nasvědčují hypotézám, že by se tyto pokročilí parazité nemuseli sexuality zcela vzdát a mohli asexuálně fungovat v „řídkém“ terrestrickém prostředí jen jako dočasné linie (v rámci „výměny“ genetické informace typu *Nosema-Vairimorpha* i *Nosema-Nosema*).

V návaznosti na diskusi a námi studovanou skupinu mikrosporidií z Trichopter a Lepidopter lze kombinovaná data publikací (1-5) a abstrakt (7,8) předkládané disertační práce shrnout do následujícího závěru (modelové hypotézy):

- (i) s výjimkou hypotetického předka rodu *Vavraia* jehož zástupci se vyskytují u primitivních Lepidopter i Trichopter neměly v současnosti známé mikrosporidie parazitující u obou hostitelských skupin společného přímého předka. Do obou hostitelských skupin vstoupily mikrosporidie nezávisle pravděpodobně z předků, kteří parazitovali u několika skupin korýšů, z nich radiovali a v koevolučních vztazích s dalšími hostitelskými skupinami speciovali do současného rodového spektra. Klíčovou roli v radiaci do terrestrického prostředí sehrál pravděpodobně kontakt a přeskok mikrosporidiálních předků z původně korýších hostitelů na hmyzí hostitele s larválním vývojem ve vodě a následné nezávislé šíření a přeskoky na další hostitele na souši.
- (ii) model radiace původně korýších mikrosporidií do dalších hostitelských skupin svázaných s nimi ekologicky má pravděpodobně širší platnost, zdá se platný pro většinu dosavadních mikrosporidií u kterých máme molekulárně biologické znaky umožňující fylogenetickou analýzu (viz. obr. 41 publikace kap. 4.1). I ve skupinách, kde nebyl dosud detekován (mezi)hostitel ze skupiny korýšů (klady VII, VIII obr. 41 kap. 4.1) se vyskytují hostitelské skupiny hmyzu s larválním vývojem ve vodě.
- (iii) vícehostitelské cykly mikrosporidií hmyzu s larválním vývojem ve vodě a mezihostiteli v korýších (vysoce pravděpodobně i u mikrosporidií z Trichopter) by mohly být pozůstatkem této ancestrální radiace a následné koevoluční speciace.
- (iv) naopak fylogenetické vztahy mezi druhy rodu *Nosema* a *Vairimorpha* (z Lepidopter) lišících se ztrátou meiotické (sexuální) fáze sporogonie by

mohly být pozůstatkem dřívější ztráty korýšního (mezi)hostitele a adaptací na ekologické podmínky terrestrického prostředí; blízká fylogenetická příslušnost se strukturálně shodnými druhy rodů *Nosema* a *Vairimorpha* z amfipodních a dekapodních korýšů toho může být důkazem - rody *Nosema* resp. *Vairimorpha* by mohly být odvozené z původních dimorfních mikrosporidií korýšů (ancestrálního rodu *Thelohania* obsahujícího oddělené sexuální i asexuální sekvence vývojového cyklu); ekologické charakteristiky nasvědčují že geneticky polymorfní „druhy“ rodu *Nosema* fungují jako asexuální linie, které však nemusely trvale ztratit sexualitu.

- (v) současná taxonomie a klasifikace mikrosporidií je bazálně chybná a neodpovídá fylogenetickým vztahům, všechny strukturálně-vývojové znaky používané v dřívějších klasifikacích pro vyšší taxonomické jednotky mají pleziomorfní charakter, znaky používané pro nižší taxonomické jednotky jsou zatíženy homopláziemi; následující klasifikace se pravděpodobně neobejdou bez sekvenčních (molekulárně taxonomických) znaků - s jistotou pro vyšší taxonomické jednotky a pravděpodobně i jejich podílem u nižších taxonomických jednotek; strukturální a ekologické znaky (hostitelská příslušnost) budou mít pravděpodobně jen doplňkový, diagnostický charakter a budou muset reflektovat heterogenní povahu těchto znaků u vícehostitelských druhů.

## 7.CITACE

- Adler, P. H., Becnel, J. J., Moser, B. 2000. Molecular characterization and taxonomy of a new species of Caudosporidae (Microsporidia) from black flies (Diptera: Simuliidae) with host-derived relationships of the North American caudosporids. *J Invertebr Pathol.* 75(2):133-43.
- Andreadis T., Maier C., Lemmon C. 1996. *Orthosomella lambdinae* n. sp. (Microsporidia: Unikaryonidae) from the Spring Hemlock Looper, *Lambdina athasaria* (Lepidoptera: Geometridae). *J Invertebr Pathol* 67: 169-177.
- Azevedo, C. 2001. Ultrastructural aspects of a new species, *Vavraia mediterranea* (Microsporidia, Pleistophoridae), parasite of the French mediterranean shrimp, *Crangon crangon* (Crustacea, Decapoda). *J. Invertebr. Pathol.*, 78:194–200.
- Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Maddox, J.V. and Undeen, A.H. 1994. Phylogenetic relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* species (Microspora) based on ribosomal RNA sequence data. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 100-106.
- Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Didier, E.S., Maddox, J.V. and Shadduck, J.A. 1995. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with emphasis on AIDS related forms. *J. Euk. Microbiol.* 42: 564-570.
- Baker, M. D., Vossbrinck, C. R., Becnel, J. J. & Maddox, J. V. 1997. Phylogenetic position of *Amblyospora* Hazard & Oldacre (Microspora: Amblyosporidae) based on small subunit rRNA data and its implication for the evolution of the Microsporidia. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 44:220–225.
- Baker, M.D., Vossbrinck, C.R., Becnel, J.J., Andreadis, T.G., 1998. Phylogeny of *Amblyospora* (Microsporidia: Amblyosporidae) and related genera based on small subunit ribosomal DNA data: a possible example of host parasite cospeciation. *J. Invertebr. Pathol.* 71: 199-206.
- Becnel, J. J., White, S. E. Shapiro A. M. 2005. Review of microsporidia-mosquito relationships: from the simple to the complex. *Folia Parasitologica* 52: 41-50.
- Bell AS, Aoki T, Yokoyama H. 2001. Phylogenetic relationships among microsporidia based on rDNA sequence data, with particular reference to fish-infecting *Microsporidium balbiani* 1884 species. *J Eukaryot Microbiol.* 48(3):258-65.
- Bronnvall A. M. & Larsson J. I. R. 1994. *Flabelliforma ostracodae* n. sp. (Microspora, Duboscqiidae), a new microsporidian parasite of *Candona* sp. (Crustacea, Ostracoda). *Eur J Protistol* 30: 280-287.
- Bronnvall A. M., Larsson J. I. R. 2001. Ultrastructure and light microscopic cytology of *Agglomerata lacrimae* n. sp. (Microspora, Doboscqiidae), a microsporidian parasite of *Acanthocyclops vernalis* (Copepoda, Cyclopidae). *Eur. J. Protistol.* 37: 89-101.
- Brown, A. M., Adamson, M. L. 2006. Phylogenetic distance of *Thelohania butleri* Johnston, Vernick, and Sprague, 1978 (Microsporidia; Thelohaniidae), a parasite of the smooth pink shrimp *Pandalus jordani*, from its congeners suggests need for major revision of the genus *Thelohania* Henneguy, 1892. *J Eukaryot Microbiol.* 53(6): 445-55.
- Brosson D, Kuhn L, Delbac F, Garin J, P Vivares C, Texier C. 2006. Proteomic analysis of the eukaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics.* 6(12): 3625-35.
- Cali, A. and El Garhy, M.. 1991. Ultrastructural study of the development of *Pleistophora schubergi* Zwoelfer, 1927 (Protozoa: Microsporidia) in larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* and its subsequent taxonomic change to the genus *Endoreticulatus*. *J. Protozool.* 38: 271-278.
- Cali A, Takvorian PM, Lewin S, Rendel M, Sian CS, Wittner M, Tanowitz HB, Keohane E, Weiss LM. 1998. *Brachiola vesicularum*, n. g., n. sp., a new microsporidium associated with AIDS and myositis. *J Eukaryot Microbiol.* 45(3):240-51.
- Canning, E. U., Barker, R. J., Nicholas, P. J. and Page, A. M. 1985. The ultrastructure of three microsporidia from winter moth, *Operophtera brumata* (L.), and the establishment of a new genus *Cystosporogenes* n.g. for *Pleistophora operophterae* (Canning, 1960). *Systematic parasitology* 7 (3): 213-225.
- Canning, E. U. & Lom, J. 1986. *The Microsporidia of Vertebrates*. Academic Press, London, UK. 289 p.
- Canning, E. U. 1990. Microspora. In Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., Chapman, D., Jones, J., ed. *Handbook of Protoctista*. Bartlett, Boston. p. 53-72.
- Canning, E. U., Wigley P. J., Barker R. J. 1991. *Orthosomella* nomen novum for the junior homonym *Orthosoma* Canning, Wigley and Barker, 1983. *J Invertebr Pathol* 58:464

- Canning, E. U., Curry, A., Cheney, S., Lafranchi-Tristem, N. J., Haque, M. A. 1999. *Vairimorpha imperfecta* n.sp., a microsporidian exhibiting an abortive octosporous sporogony in *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Parasitology*. 119 (3): 273-86.
- Canning EU, Curry A, Cheney SA, Lafranchi-Tristem NJ, Kawakami Y, Hatakeyama Y, Iwano H, Ishihara R. 1999b. *Nosema tyriae* n.sp. and *Nosema* sp., microsporidian parasites of Cinnabar moth *Tyria jacobaeae*. *J Invertebr Pathol*. 74 (1):29-38.
- Canning, E. U., Vávra, J., 2000. Phylum Microsporidia Balbiani, 1882. In: J.J. Lee, G. F. Leedale, P. Bradbury (Eds). The Illustrated Guide to the Protozoa (2nd Edition), Vol. 1. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, pp. 39-126.
- Canning, E. U., Refardt, D., Vossbrinck, C. R., Okamura, B., Curry, A. 2002: New diplokaryotic microsporidia (Phylum Microsporidia) from freshwater bryozoans (Bryozoa, Phylactolaemata). *Eur. J. Protistol.* 38: 247–265.
- Canning E.U., Curry A., Overstreet R.M. 2002b. Ultrastructure of *Tuzetia weidneri* sp. n. (Microsporidia : Tuzetiidae) in skeletal muscle of *Litopenaeus setiferus* and *Farfantepenaeus aztecus* (Crustacea : Decapoda) and new data on *Perezia nelsoni* (Microsporidia : Pereziiidae) in *L.setiferus*. *Acta Protozoologica* 41 (1): 63-77.
- Cavalier-Smith T. 1983. A six-kingdom classification and a unified phylogeny. In *Endocytobiology II: Intracellular Space as Oligogenetic*, ed. HEA Schenk, WS Schwemmler, pp. 1027–34. Berlin: Walter de Gruyter & Co.
- Cheney, S. A., Lafranchi-Tristem, N. J. & Canning, E. U. 2000. Microsporidia based on small subunit ribosomal DNA sequences and implications for the source of *Trachipleistophora hominis* infections. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47:280–287.
- Cheney, S. A., Lafranchi-Tristem, N. J., Bourges, D. & Canning, E. U. 2001. Relationships of microsporidian genera, with emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1). *J. Eukaryot. Microbiol.*, 48:111–117.
- Cummings M.P., Otto S.P., Wakeley J.1995. Sampling properties of DNA-sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. biol. and Evol.* 12 (5): 814-822
- Curgy, J.J., Vávra, J. and Vivares, C.. 1980. Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biologie Cellulaire* 38: 49-52.
- David, L. 1988. Infekční proces mikrosporidií u lepidopter. Disertační práce, ENTÚ ČSAV, České Budějovice, 41-177.
- Didier, E. S., C. R. Vossbrink, M. D. Baker, L. B. Rogers, D. C. Bertucci, and J. A. Shaddock. 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111:411–421.
- Didier, E. S., L. B. Rogers, J. M. Orenstein, M. D. Baker, C. R. Vossbrink, T. Van Gool, R. Hartskeerl, R. Soave, and L. M. Beaudet. 1996. Characterization of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:34–43.
- Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng LT, Wu X, Reith M, Cavalier-Smith T, Maier UG. 2001. The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature*. 410 (6832):1091-6.
- Edlind TD, Li J, Visvesvara GS, Vodkin MH, McLaughlin GL, Katiyar SK. 1996. Phylogenetic analysis of tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5:359–67
- Fast, N. M., Logsdon, J. M. & Doolittle, W. F. 1999. Phylogenetic analysis of the TATA box binding protein (TBP) gene from *Nosema locustae*: evidence for a microsporidia–fungi relationship and spliceosomal intron loss. *Mol. Biol. Evol.*, 16:1415–1419.
- Felsenstein, J., 2001. PHYLIP, Phylogeny Inference Package (Department of Genetics, University of Washington, Seattle), Version 3.6a3.
- Findley, A. M, Weidner, E. H, Carman, K. R., Xu, Z., Godbar, J. S. 2005. Role of the posterior vacuole in *Spraguea lophii* (Microsporidia) spore hatching. *Folia Parasitol* . 2005 52(1-2):111-7.
- Fries, I., Paxton, R. J., Tengö, J., Slemenda, S. B., da Silva, A. J. & Pieniasek, N. J. 1999. Morphological and molecular characterization of *Antonosporea scoticae* n. gen., n. sp. (Protozoa, Microsporidia) a parasite of the communal bee, *Andrena scotica* Perkins, 1916 (Hymenoptera, Andrenidae). *Europ. J. Protistol.*, 35:183–193.



- Gatehouse, H. S., Malone, L. A. 1998. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microsporida): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J Invertebr Pathol.* 71(2):97-105.
- Germot A, Philippe H, Le Guyader H. 1997. Evidence for loss of mitochondria in Microsporida from a mitochondrial type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87:159-68
- Gill, E. E. & Fast, N. M. 2006. Assessing the microsporidia-fungi relationship: combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene* 375, 103-109.
- Gilson PR, McFadden GI. 2002. Jam packed genomes - a preliminary, comparative analysis of nucleomorphs. *Genetica.* 115(1):13-28.
- Green, J. 1974: Parasites and epibionts of Cladocera. *Trans. Zool. Soc. Lond.* 32: 417-515.
- Gresoviac, S. J., Khattra, J. S., Nadler, S. A., Kent, M. L., Devlin, R. H., Vivares, C. P., Fuente, E. DeLa & Hedrick, R. P. 2000. Comparison of small subunit ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer sequences among isolates of the intranuclear microsporidian *Nucleospora salmonis*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47:379-387.
- Graur D. and Li W.-H. 1999. Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. p 1-479.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52 (5). 696-704.
- Gurley, R. 1893. On the classification of the Myxosporidia, a group of protozoan parasites infecting fishes. Article 10 in *Bull. U.S. Fish Comm. for 1891.* 11: 407-420.
- Hall, B. D., Liu, Y. J. J., Hodson, M.C. 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology* 6: Art. No. 74.
- Haro M, Del Aguila C, Fenoy S, Henriques-Gil N. 2003. Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *J Clin Microbiol.* 41(9):4166-71.
- Hinkle G, Morrison HG, Sogin ML. 1997. Genes coding for reverse transcriptase, DNA-directed RNA polymerase, and chitin synthase from the microsporidian *Spraguea lophii*. *Biol. Bull.* 193:250-51.
- Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, Canning EU, Embley TM. 1997. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr. Biol.* 7:995-98.
- Hirt, R. P., Logsdon, J. M., Healy, B., Dorey, M. W., Doolittle, W. F. & Embley, T. M. 1999. Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:580-585.
- Hollister, W. S., E. U. Canning, and C. L. Anderson. 1996. Identification of microsporidia causing human disease. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:104-105.
- Huang, W. F., Tsai, S. J., Lo, C. F., Soichi, Y. & Wang, C. H. 2004. The novel organization and complete sequence of the ribosomal gene of *Nosema bombycis*. *Fung. Genet. Biol.*, 41:473-481.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Hylíš, M., Weiser, J., Oborník, M., Vávra, J., 2005. DNA isolation from museum and type collection slides of microsporidia. *J. Invertebr. Pathol.* 88, 257-260.
- Hylíš M, Oborník M, Nebesářová J, Vávra J. 2007. Aquatic tetrasporoblastic microsporidia from caddis flies (Insecta, Trichoptera): Characterisation, phylogeny and taxonomic reevaluation of the genera *Episeptum* Larsson, 1986, *Pyrotheca* Hesse, 1935 and *Cougourdella* Hesse, 1935. *Eur J Protistol.* 43 (3): 205-224.
- Ironside, J. E. 2007. Multiple losses of sex within a single genus of Microsporidia. *BMC Evol Biol.* 7:48.
- Ishihara, R. and Hayashi, Y.. 1968. Some properties of ribosomes from the sporoplasm of *Nosema bombycis*. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 377-385.
- Issi, I. V. 1986. Mikrosporidii kak tip paraziticheskich prostějšich. In: Mikrosporidii (Beyer T. V. a Issi I. V., Eds) Series Protozoologija 10, Nauka, Leningrad, 60-72, 105-117.
- Iwano, H. and Ishihara, R. 1991. Dimorphic development of *Nosema bombycis* spores in gut epithelium of larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Sericult. Sci. Jpn.* 60: 249-256.

- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Fraker, E., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., Celio, G., Gueidan, C. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443:818-822.
- Kamaishi T, Hashimoto T, Nakamura Y, Nakamura F, Murata S, et al. 1996. Protein phylogeny of translation elongation factor EF-1 suggests Microsporidians are extremely ancient eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 42: 257–63.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, M'et'enier G, Thomarat F, et al. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414: 450–53.
- Kawakami, Y., Inoue, T., Ito, T., Kitamisu, K., Hanawa, C., Ando, T., Iwano, H. & Ishihara, R. 1994. Identification of a chromosome harbouring the small sub-unit ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *J. Invert. Pathol.*, 64:147–148.
- Keeling PJ, Doolittle WF. 1996. Alphatubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Mol. Biol. Evol.* 13: 1297–305.
- Keeling, P. J., Luker, M. A. & Palmer, J. D. 2000. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 23–31.
- Keeling, P. J. and Fast N.M. 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56:93-116.
- Kudo, R. 1924. A biologic and taxonomic study of the microsporidia. III. *Biol. Monogr.* 9: 1-268.
- Labbé, A. 1899. Sporozoa. In Buetschli, O., ed. *Das Tierreich*. Friedlander u. Sohn, Berlin. 5 Lief. 180 pp.
- Langdon, J. S. 1991. Description of *Vavraia parastacida* Sp. Nov. (Microspora: Pleistophoridae) from marron *Cherax tenuimanus* (Smith), (Decapoda: Parastacidae). *J. Fish Dis.*, 14:619–629.
- Lange C. E., Solter L. F., Baker M. D., Johny S., Whitman D. W. and Ann Cali A. 2006. Discovery of an *Encephalitozoon* sp. (Fungi: Microsporidia) in an invertebrate host. 9th Int. Colloq. on Invert. Pathol. and Microb. Control, 39th Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, Wuhan-China-August 27 to September 1, 2006. abstract.
- Larsson R. 1979. Transmission of *Nosema mesnili* (Paillet) (Microsporida, Nosematidae), a microsporidian parasite of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera, Pieridae) and its parasite *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera, Braconidae). *Zool Anz* 203: 151-157.
- Larsson, R. 1981. An ultrastructural study of *Amblyospora undulata* n. sp., a microsporidian parasite of the caddis fly *Cyrrnus trimaculatus* (Trichoptera, Polycentropodidae). *Protistologica* 17: 511-523.
- Larsson, R. 1986. Ultrastructure, function and classification of microsporidia, p.1-390. In J.O. Corliss and D.J. Patterson (ed.), *Progress in Protistology*, Vol. 1., Biopress Ltd. Bristol, U.K.
- Larsson, R. 1986b. Ultrastructural study and description of *Vavraia holocentropi* n. sp. (Microspora, Pleistophoridae), a parasite of larvae of the caddisfly *Holocentropus dubius* (Trichoptera, Polycentropodidae). *Protistologica* 22: 441-452.
- Larsson J. I. R., Ebert D., Vávra J., Voronin V. N. 1996: Redescription of *Pleistophora intestinalis* Chatton, 1907, a microsporidian parasite of *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*, with establishment of the new genus *Glugoides* (Microspora, Glugeidae). *Eur. J. Protistol.* 32: 251-261.
- Larsson J. I. R. 1997. Microsporidia and microcrustaceans. *J Euk Microbiol* 44: 43A
- Larsson J. I. R. 1999. Identification of microsporidia. *Acta Protozool.* 38: 161-197.
- Larsson J. I. R. 2005. Molecular versus morphological approach to microsporidian classification. *Folia Parasitol* 52(1-2):143-4.
- Leiro, J., Siso, M. I., Parama, A., Ubeira, F. M., Sanmartin, M. L. 2000. RFLP analysis of PCR-amplified small subunit ribosomal DNA of three fish microsporidian species. *Parasitology.* 120 (2):113-9.
- Liu, Y. J. J., Hodson, M. C., Hall, B. D. 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology* 6: 74.
- Lom, J., Nilsen, F. & Dyková, I., 2001, *Thelohania contejeani* Henneguy, 1892: dimorphic life cycle and taxonomic affinities as indicated by ultrastructural and molecular study. *Parasitology Research* 87: 860-872.
- Lom J, Nilsen F. 2003. Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *Int J Parasitol.* 33(2): 107-27.

- Maddox, J.V., Baker, M.D., Jeffords, M.R., Kuras, M., Linde, A., Solter, L.F., McManus, M.L., Vávra, J. and Vossbrinck, C.R., 1999. *Nosema portugal*, N. SP., isolated from the gypsy moths (*Lymantria dispar* L.) collected in Portugal. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 1-14.
- Malone, L.A.. 1984. A comparison of the development of *Vairimorpha plodiae* and *Vairimorpha necatrix* in the indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 43: 140-149.
- Malone, L. A., Wigley, P. J. & Dhana, S. D. 1987. Identity of a microsporidium from three New Zealand pasture insects: *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabeidae), *Wiseana* spp. (Lepidoptera, Hepialidae), and *Listronotus bonariensis* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 49:135-144.
- Malone, L. A., McIvor, C. A. 1996. Use of nucleotide sequence data to identify a microsporidian pathogen of *Pieris rapae* (Lepidoptera, Pieridae). *J. Invertebr. Pathol.* 68(3): 231-8.
- Martinez, M. A., Vivares, C. P., Bouix G. 1993. Ultrastructural Study of *Endoreticulatus durforti* N. Sp., a New Microsporidian Parasite of the Intestinal Epithelium of *Artemia* (Crustacea, Anostraca) *J Eukaryot Microbiol.* 40 (5): 677-687.
- Mathis, A., M. Michel, H. Kuster, C. Muller, R. Weber, and P. Deplazes. 1997. Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology* 114:29-35.
- Mathis, A., Tanner, I., Weber, R., Deplazes, P. 1999. Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int J Parasitol.* 29(5):767-70.
- Moodie, E. G., Le Jambre, L. F., Katz, M. E. 2003. *Thelohania montirivulorum* sp. nov. (Microspora: Thelohaniidae), a parasite of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae): fine ultrastructure, molecular characteristics and phylogenetic relationships. *Parasitol Res.* 91(3):215-28.
- Moodie, E. G., Le Jambre, L. F., Katz, M. E. 2003b. Ultrastructural characteristics and small subunit ribosomal DNA sequence of *Vairimorpha cheracis* sp. nov., (Microspora: Burenellidae), a parasite of the Australian yabby, *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *J Invertebr Pathol.* 84(3):198-213.
- Moodie, E. G., Le Jambre, L. F., Katz, M. E. 2003c. *Thelohania parastaci* sp. nov. (Microspora: Thelohaniidae), a parasite of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *Parasitol Res.* 91(2):151-65.
- Morris DJ, Terry RS, Ferguson KB, Smith JE, Adams A. 2005. Ultrastructural and molecular characterization of *Bacillidium vesiculoformis* n. sp. (Microspora: Mrazekiidae) in the freshwater oligochaete *Nais simplex* (Oligochaeta: Naididae). *Parasitology.* 130(1):31-40.
- Moser, B.A., Becnel, J.J., Maruniak, J., Patterson, R.S., 1998. Analysis of the ribosomal DNA sequences of the microsporidia *Thelohania* and *Vairimorpha* of fire ants. *J. Invertebr. Pathol.* 72: 154-159.
- Moser, B. A., Becnel, J. J., Williams, D. F. 2000. Morphological and molecular characterization of the *Thelohania solenopsae* complex (Microsporidia: Thelohaniidae). *J Invertebr Pathol.* 75(2):174-7.
- Muller, A., Trammer, T., Chioralia, G., Seitz, H. M., Diehl, V. & Franzen, C. 2000. Ribosomal RNA of *Nosema algerae* and phylogenetic relationship to other microsporidia. *Parasitol. Res.*, 86:18-23.
- Nilsen F, Endresen C, Hordvik I. 1998. Molecular phylogeny of microsporidians with particular reference to species that infect the muscles of fish. *J Eukaryot Microbiol.* 45(5):535-43.
- Nilsen, F., 1999. Small subunit rDNA phylogeny of *Bacillidium* sp. (Microspora, Mrazekiidae) infecting oligochaets. *Parasitology* 118: 553-558.
- Nilsen F. 2000. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia with particular reference to genera that infect fish. *J Parasitol.* 86(1):128-33.
- Nilsen, F. & Chen, W. J., 2001, rDNA phylogeny of *Intrapredatorus barri* (Microsporidia: Amblyosporidae) parasitic to *Culex fuscanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). *Parasitology* 122: 617-623.
- O'Mahony, E. M., Tay, W. T., Paxton, R. J. 2007. Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *J Eukaryot Microbiol.* 54(1):103-9.
- Peyretailade E, Broussolle V, Peyret P, M'et'enier G, Gouy M, Vivar'es CP. 1998. Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol. Biol. Evol.* 15: 683-89.
- Pilarska, D., Linde, A., Solter L., McManus, M., Takov, D. 2002. New Data on the Biology of the Microsporidium *Endoreticulatus schubergi* Infecting the Browntail Moth, *Euproctis chrysorrhoea* (Lepidoptera: Lymantriidae) *Acta zool. bulg.*, 54 (1): 55-62.

- Pilley, B.M. 1976. A new genus *Vairimorpha* (Protozoa: Microsporida) for *Nosema necatrix* Kramer 1965: pathogenicity and life cycle in *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 28:177-183.
- Pomport-Castillon, C., B. Romestand, and J. F. De Jonckheere. 1997. Identification and phylogenetic relationships of microsporidia by riboprinting. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44:540-544.
- Rao, S. N., Nath, B. S., Saratchandra, B. 2005. Characterization and phylogenetic relationships among microsporidia infecting silkworm, *Bombyx mori*, using inter simple sequence repeat (ISSR) and small subunit rRNA (SSU-rRNA) sequence analysis. *Genome.* 48(3):355-66.
- Rao, S. N., Nath, B. S., Bhuvaneshwari, G., Urs, S. R. 2007. Genetic diversity and phylogenetic relationships among microsporidia infecting the silkworm, *Bombyx mori*, using random amplification of polymorphic DNA: Morphological and ultrastructural characterization. *J Invertebr Pathol.* [Epub ahead of print]
- Raper, J. R. and Flexer, A. S. 1970. The road to diploidy with emphasis on a detour. In 20<sup>th</sup> Symposia of Soc. Gen. Microbiol. Cambridge Univ. Press, 401-432.
- Refardt D, Canning EU, Mathis A, Cheney SA, Lafranchi-Tristem NJ, Ebert D. 2002. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia that infect *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Parasitology.* 124(4):381-9.
- Refardt D, Mouton L. 2007. Reverse arrangement of rRNA subunits in the microsporidium *Glugoides intestinalis*. *J Eukaryot Microbiol.* 54(1):83-5.
- Rinder, H., S. Katzwinkel-Wladarsch, and T. Loescher. 1997. Evidence for the existence of genetically distinct strains of *Enterocytozoon bieneusi*. *Parasitol. Res.* 83: 670-672.
- Sene A., Ba Ch. T., Marchand B., Toguebaye B. S. 1997. Ultrastructure of *Unikaryon nomimoscolexi* n. sp. (Microsporida, Unikaryonidae), a parasite of *Nomimoscolex* sp. (Cestoda, Proteocephalidea) from the gut of *Clarotes laticeps* (Pisces, Teleostei, Bagridae). *Dis. Aquat. Org.* Vol. 29: 35-40.
- Silveira H., Canning E. U. 1995. *Vittaforma corneae* n. comb. for the human microsporidium *Nosema corneum* Shadduck, Meccoli, Davis & Font, 1990, based on its ultrastructure in the liver of experimentally infected athymic mice. *J Eukaryot Microbiol.* 42(2):158-65.
- Slamovits, C. H, Williams, B. A, Keeling P. J. 2004. Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonospora locustae* n. comb. based on molecular and ultrastructural data. *J Eukaryot Microbiol.* 51(2): 207-13.
- Sokolova YY, Dolgikh VV, Morzhina EV, Nassonova ES, Issi IV, Terry RS, Ironside JE, Smith JE, Vossbrinck CR. 2003. Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* Gen. Nov., Comb. Nov. (Sokolova, Seleznirov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg. *J Invertebr Pathol.* 84(3):159-72.
- Sokolova YY, Kryukova NA, Glupov VV, Fuxa JR. 2006a. *Systemostrema alba* Larsson 1988 (Microsporidia, Thelohaniidae) in the Dragonfly *Aeshna viridis* (Odonata, Aeshnidae) from South Siberia: morphology and molecular characterization. *J Eukaryot Microbiol.* 53(1):49-57.
- Sokolova YY, Lange CE, Fuxa JR. 2006b. Development, ultrastructure, natural occurrence, and molecular characterization of *Liebermania patagonica* n. g., n. sp., a microsporidian parasite of the grasshopper *Tristira magellanica* (Orthoptera: Tristiridae). *J Invertebr Pathol.* 91(3):168-82.
- Sprague, V. 1977. Systematics of the Microsporidia, p.1-510. In L.A. Bulla, Jr. and T.C. Cheng (ed.), Comparative Pathobiology, Vol. 2. Systematics of Microsporidia. Plenum Press, N.Y., London.
- Sprague, V., Becnel, J.J. and Hazard, E.I.. 1992. Taxonomy of Phylum Microspora. *Critical Reviews in Microbiology* 18:285-395.
- Swofford, D. L., 2000. PAUP\* phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods) Sinauer Associates Sunderland, MA.
- Tanabe, Y., Watanabe M. Sugiyama, J. 2005. Evolutionary relationships among basal fungi (Chytridiomycota and Zygomycota): insights from molecular phylogenetics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51: 267-276.
- Tay, W. T., O'Mahony, E. M., Paxton, R. J. 2005. Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. *J Eukaryot Microbiol.* 52(6): 505-13.

- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plesniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 24, 4876-4882.
- Terry, R. S., Smith, J. E., Bouchon, D., Rigaud, T., Duncanson, P., Sharpe, R. G. & Dunn, A. M. 1999. Ultrastructural characterisation and molecular taxonomic identification of *Nosema granulosis* n. sp., a transovarially transmitted feminising (TTF) microsporidium. *J. Eukaryotic Microbiol.* 46, 492-499.
- Terry, R. S., Smith, J. E., Sharpe, R. G., Rigaud, T., Littlewood, D. T., Ironside, J. E., Rollinson, D., Bouchon, D., MacNeil, C., Dick, J. T., Dunn, A. M. 2004. Widespread vertical transmission and associated host sex-ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora. *Proc Biol Sci.* 271(1550): 1783-9.
- Tsai, S. J., Lo, C. F., Soichi, Y., Wang, C. H. 2003. The characterization of microsporidian isolates (Nosematidae: *Nosema*) from five important lepidopteran pests in Taiwan. *J. Invertebr Pathol.* 83(1): 51-9.
- Tsai, S. J., Huang, W. F., Wang, C. H. 2005. Complete sequence and gene organization of the *Nosema spodopterae* rRNA gene. *J Eukaryot Microbiol.* 52(1):52-4.
- Tuzet, O., Maurand, J., Fize J.A., Michel R., Fenik, B. 1971: Proposition d'un nouveau cadre systematique pour les genres de Microsporidies. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 272: 1268-1271.
- Van de Peer, Y., Ben Meyer, A. 2000. Microsporidia: accumulating molecular evidence that aAli, A. group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene* 246, 1-8.
- Vávra, J., 1964a. Recording microsporidian spores. *J. Insect Pathol.* 6, 258-260.
- Vávra, J., 1964b. A failure to produce an artificial infection in cladoceran Microsporidia. *J. Protozool.* 11 (Suppl.), 35-36.
- Vávra, J., Maddox, J. V., 1976. Methods in microsporidology. In: Bulla, I. A., Cheng, T. C. (Eds), *Comparative Pathobiology*. Vol. 1. Plenum Press New York, London, pp. 281-319.
- Vávra, J. & Larsson, R. 1999. Structure of the Microsporidia. In: Wittner, M. & Weiss, L. (ed.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC. p. 7-84.
- Vávra, J., Hyliš, M., Oborník, M., Vossbrinck, C. R., 2005. Microsporidia in aquatic microcrustacea: the copepod microsporidium *Marssoniella elegans* Lemmermann, 1900 revisited. *Folia Parasitologica* 52 (1-2), 163-172.
- Vávra J., Hyliš M., Vossbrinck C.R., Pilarska D.K., Linde A., Weiser J., McManus M.L., Hoch G., Solter L.F. 2006a. *Vairimorpha disparis* n. comb. (Microsporidia: Burenellidae): A redescription and taxonomic revision of *Thelohania disparis* Timofejeva 1956, a microsporidian parasite of the gypsy moth *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *J Eukaryot Microbiol.* 53(4):292-304.
- Vávra J., Horák A., Modrý D., Lukeš J., Koudela B. 2006b. *Trachipleistophora extenrec* n. sp. a new microsporidian (fungi: microsporidia) infecting mammals. *J Eukaryot Microbiol.* 53(6):464-76.
- Voronin, V. N., Melnikova, O. Y. 1984. *Vavraia cyclocypris* sp. n., the first find of a microsporidian parasite from Ostracoda (Crustacea). *Parazitologiya*, 18: 482-484.
- Voronin, V. N. 1991. Ultrastructure of the microsporidian *Encephalitozoon vrevi* sp. nov. from the cyclops *Macrocyclops distinctus*. *Tsitologiya* 33(7): 9-14
- Vossbrinck C. R., Woese C. R. 1986. Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* 320: 287-88
- Vossbrinck, C. R., Andreadis, T. G. Debrunner-Vossbrinck, B. A. 1998. Verification of intermediate hosts in the life cycles of microsporidia by small subunit rDNA sequencing. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45: 290-292.
- Vossbrinck, C. R., Andreadis, T. G., Vávra, J., Becnel, J. J., 2004. Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic microsporidia (Microsporidia : Amblyosporidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* 51 (1), 88-95.

- Vossbrinck, C. R. & Debrunner-Vossbrinck, B. A. 2005. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol.*, 52:131–142.
- Wang, C.Y., Solter, L. F., Tsui, W.H., Wang C. H. 2005. An *Endoreticulatus* species from *Ocinara lida* (Lepidoptera: Bombycidae) in Taiwan. *J. Invertebr. Pathol.*, 89 (2): 123-135.
- Wang W, Chen J. 2007. Ultrastructural study on a novel microsporidian, *Endoreticulatus eriocheir* sp. nov. (Microsporidia, Encephalitozoonidae), parasite of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda). *J Invertebr Pathol.* 94(2):77-83.
- Weiser, J. 1946. Studie o mikrosporidiích z larev hmyzů našich vod. The Mikrosporidia of Insect larvae. *Věst. čs. spol. zool.* 10: 245-272.
- Weiser, J. 1961. Die Mikrosporidien als Parasiten der Insekten.. Monographien zur Angewandte Entomologie 17. Paul Parey Vrlg., Hamburg und Berlin. 149 pp.
- Weiser, J. 1966. Nemoci hmyzu. Academia, Praha, 380-482.
- Weiser, J. 1977. Contribution to the classification of microsporidia. *Věst. čs. spol. zool.* 41:308-320.
- Weiser, J., David, L., 1997. A light and electron microscopic study of *Larssoniella resinellae* n. gen., n. sp. (Microspora, Unikaryonidae), a parasite of *Petrova resinella* (Lepidoptera, Tortricidae) in central Europe. *Arch. f. Protistenk.* 147 (3-4): 405-410.
- Weiser J., Haendel U., Wegensteiner R. and Žižka Z. 2002. *Unikaryon polygraphi* sp.n. (Protista, Microspora): a new pathogen of the four-eyed spruce bark beetle *Polygraphus poligraphus* (Col., Scolytidae). *J. Appl. Ent.* 126: 148–154.
- Weiser, J., Holuša, J., Žižka, Z. 2006. *Larssoniella duplicati* n.sp. (Microsporidia, Unikaryonidae), a newly described pathogen infecting the double-spined spruce bark beetle, *Ips duplicatus* (Coleoptera, Scolytidae) in the Czech Republic. *J Pest Sci* 79: 127–135.
- Weiss, L. M., Vossbrinck, C. R., 1999. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In: Wittner, M., Weiss, L. M.(Eds), “The Microsporidia and Microsporidiosis”. AMS Press, Washington, D.C., pp.129-171.
- Wittner, M., Weiss, L. M. 1999. “The Microsporidia and Microsporidiosis”. AMS Press, Washington, D.C., pp.1-553.
- Xu J, Pan G, Fang L, Li J, Tian X, Li T, Zhou Z, Xiang Z. 2006. The varying microsporidian genome: existence of long-terminal repeat retrotransposon in domesticated silkworm parasite *Nosema bombycis*. *Int J Parasitol.* 36(9):1049-56. Erratum in: *Int J Parasitol.* 2006 36(14):1543-4.