

Středoškolská odborná činnost 2005/2006

Obor 04 – biologie

Nové izoláty prvoků získané z trávicího traktu švábů (Blattodea), příspěvek k fylogenezi rodu *Hypotrichomonas* (Parabasala, Protista)

Vít Smola

Gymnázium Botičská

Botičská 1

128 01 Praha 2, 4. ročník

Autoři

&

Tomáš Pánek

Akademické Gymnázium

Štěpánská 22

110 00 Praha 1, 4. ročník

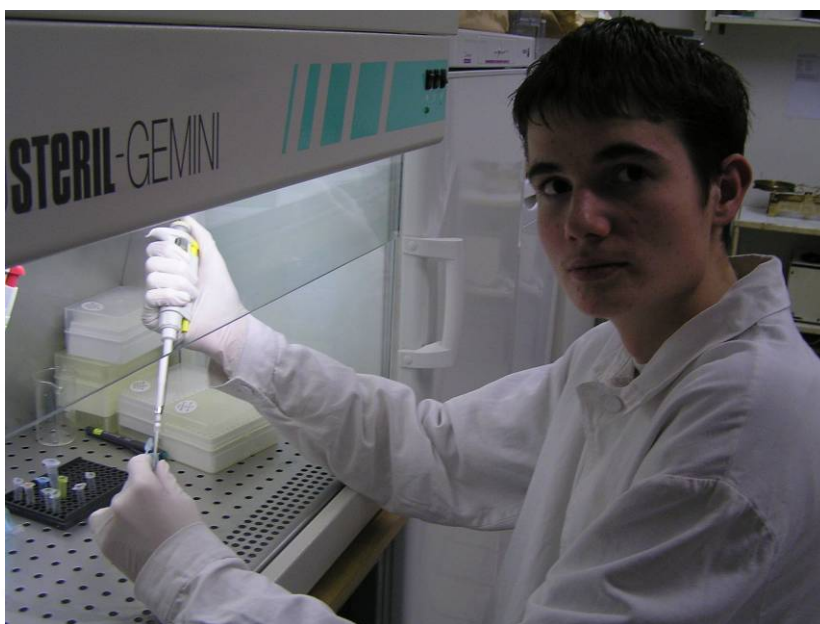
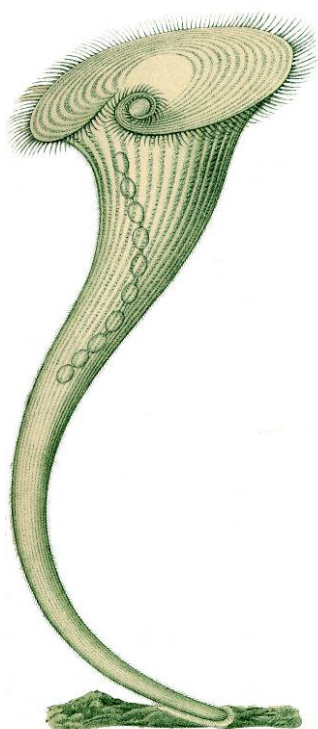
Konzultanti práce:

RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Mgr. Martin Kostka

Praha, 2006

Hlavní město PRAHA



Vít Smola



Tomáš Pánek

Prohlášení o původnosti práce

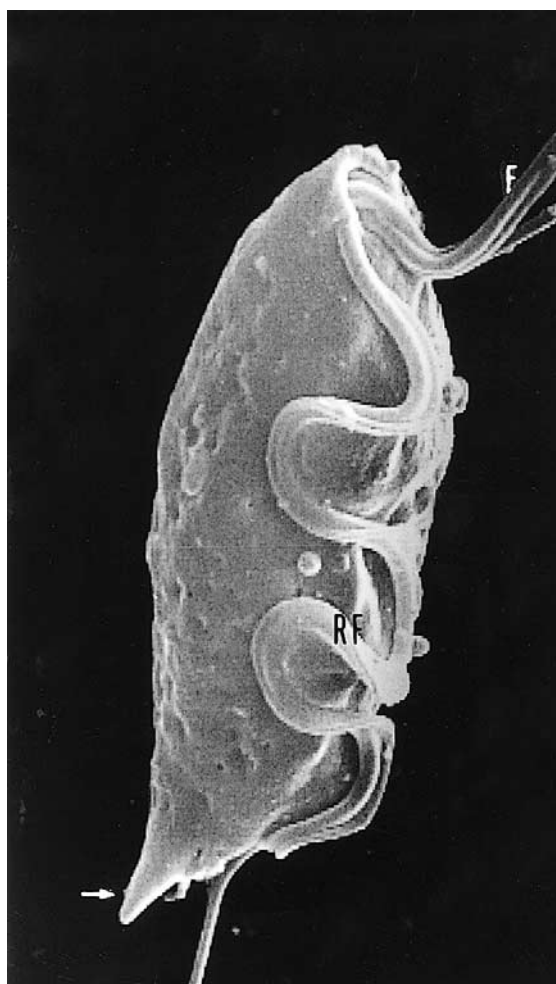
Prohlašujeme, že jsme tuto práci vypracovali samostatně pod vedením RNDr. Ivana Čepičky, Ph.D. a Mgr. Martina Kostky. Prohlašujeme, že jsme uvedli veškeré použité prameny.

V Praze, 9. 5. 2006

.....
Vít Smola, Tomáš Pánek

Obrázky nalevniků na této straně jsou převzaty z Haeckel E., *Die Kunstformen der Natur*. Bibliographisches Institut, Leipzig 1899.

Je naší milou povinností poděkovat nejen organizátorům programu Otevřená věda, pod jehož záštitou jsme uskutečnili naši stáž na katedře parazitologie PřF UK, ale zejména děkujeme našim konzultantům RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph.D. a Mgr. Martinu Kostkovi za jejich odbornou pomoc a neutuchající trpělivost. Dále bychom rádi vyjádřili poděkování Prof. RNDr. Jaroslavu Kuldovi, CSc. za zapůjčení preparátů. V neposlední řadě děkujeme Mgr. Petru Šímovi za cenné připomínky k našemu textu. Též děkujeme Mgr. Haně Šundové za jazykovou korekci našeho textu.



Úvodní obr. Fotografie druhu *Tritrichomonas foetus* pořízená scanovacím elektronovým mikroskopem. Dobře viditelné tři přední bičíky a jeden zpětný, který probíhá po celé délce těla.

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE | 7 |
| 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED | 9 |
| 2.1. Protista a jejich role v evoluci života | 9 |
| 2.2. Zaživací trakt švábů a jeho charakteristika | 10 |
| 2.3. Protista obývající zaživací trakt švábů | 11 |
| 2.4. Charakteristika kmene Parabasala | 14 |
| 2.5. Systém kmene Parabasala | 18 |
| 2.6. Evoluce skupiny Parabasala | 22 |
| 2.7. Rod <i>Hypotrichomonas</i> | 26 |
| 2.7.1. <i>Hypotrichomonas acosta</i> | 26 |
| 2.7.2. Další známé sekvence přiřazované rodu <i>Hypotrichomonas</i> | 29 |
| 3. MATERIÁL A METODY | 30 |
| 3.1. Izolace a kultivace prvků | 30 |
| 3.1.1. Složení média podle Dobell-Leidlow (Dobell a Leidlow, 1926) | 30 |
| 3.2. Barvení prvků | 31 |
| 3.2.1. Barvení podle Giemsa-Romanowski | 31 |
| 3.2.2. Barvení protargolem podle Bodiana (1917) | 32 |
| 3.3. Izolace DNA | 34 |
| 3.4. PCR a gelová elektroforéza | 35 |
| 3.4.1. Příprava roztoku pro PCR | 36 |
| 3.4.2. Vlastní PCR | 37 |
| 3.4.3. Gelová elektroforéza | 37 |
| 3.4.4. Vyhodnocení výsledků elektroforézy | 38 |
| 3.5. Určování sekvencí | 38 |
| 3.5.2. Sekvenační reakce a vlastní sekvenace | 38 |
| 3.6. Vyhodnocování sekvencí | 40 |
| 3.7. Tvorba a úprava alingmentu | 40 |
| 3.8. Fylogenetická analýza | 42 |
| 3.8.1. Metoda maximální parsimonie (Maximal parsimony; MP) | 42 |
| 3.8.2. Metoda maximální věrohodnosti (Maximum likelihood; ML) | 43 |
| 3.8.3. Metoda nejmenších čtverců Fitch margoliash (Least squares method; LS) | 44 |
| 3.8.4. Bayesova metoda (Bayesian posterior probability; Bayes) | 45 |
| 4. VÝSLEDKY | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. Získané izoláty prvoků | 47 |
| 4.2. Morfologie | 49 |
| 4.3. Fylogenetická analýza | 54 |
| 5. DISKUSE | 57 |
| 6. SHRNU TÍ | 60 |
| 6. SUMMARY | 61 |
| 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 62 |
| 8. PŘÍLOHY | 68 |
| 9. SLOVNÍČEK POJMŮ A ZKRATEK | 72 |

ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Metody molekulární biologie, obzvláště pak molekulární taxonomie, představují veliký nástroj ke studiu evoluce života. Výsledky získané pomocí molekulárně-biologických metod jsou ale často překvapivě odlišné od výsledků získaných metodami klasickými. Představy o fylogenezi prvoků (tj. jednobuněčných eukaryot, Protista¹) prodělávají neustálý vývoj v závislosti na rozvoji jak praktických, laboratorních metod, tak na vývoji počítačových technologií. Často se setkáváme s názorem, že molekulární taxonomie stojí mimo přímé vnímání přírody. Tento názor sice není nesmyslný, ale musíme si zároveň uvědomit, že celé naše poznání mikrosvěta je nepřímé a závislé na použité metodě. Skupina Protista je díky nedostatku spolehlivých metod jen velmi obtížně zkoumatelná, a proto představuje použití molekulárně-biologických metod nejen zlehčení a zpřesnění práce, ale i spoustu zcela nových možností výzkumu. Je však dle našeho přesvědčení potřeba mít neustále na paměti, že veškeré lidské poznání je jen modelem skutečnosti, nikoliv skutečností samou, proto jsme se rozhodli naše molekulárně-biologická data vždy konfrontovat s daty morfologickými.

Současný výzkum prvoků klade důraz zejména na studium modelových organismů (*Tetrahymena*). Pokud se věnuje pozornost i dalším taxonům, jsou to hlavně prvoci významní v humánní a veterinární medicíně. Jen vzácně jsou prvoci studováni v medicínsky nezajímavých zástupcích bezobratlých živočichů. Většina z takových prací se zabývá mikroflórou v termitím střevě, neboť to je z protistologického hlediska neobyčejně bohaté (symbionti trávící celulózu, koevoluce, obrovská diverzita; centrum diverzity parabasalidů).

My jsme si vybrali ke studiu diverzity prvoků zaživační trakt švábů. Vedla nás k tomu zejména příbuznost švábů (Blattodea) s termity (Isoptera), snadná dostupnost řady druhů a nedostatečná prozkoumanost jejich střevní mikroflóry.

Stanovili jsme si následující cíle:

1. Získat a pokusit se kultivovat izoláty střevních prvoků různých druhů švábů.
2. Molekulárně charakterizovat nové taxony na základě sekvence SSU rDNA a určit jejich fylogenetickou pozici.
3. Provést morfologickou analýzu kultivovaných protist.
4. Připravit případné nové taxony k popisu.

¹ Protista jsou parafyletickou skupinou organismů

Doposud se zdařila kultivace pouze několika druhů prvoků ze zažívacího traktu bezobratlých živočichů (výjimkou je skupina Kinetoplastida, jejíž zástupci se obvykle kultivují poměrně snadno). Nám se ale do stabilní kultury podařilo převést hned sedm izolátů prvoků ze střevních obsahů šesti druhů švábů, jednotlivé izoláty navíc obsahují různé druhy prvoků (zřejmě jsme první, komu se dané prvoky podařilo kultivovat). To nám značně usnadnilo další práci, neboť takto jsme mohli přiřadit sekvence k příslušným organismům bez použití metody FISH (fluorescent *in situ* hybridization), navíc environmentální PCR se nám předtím opakovaně nezdařila, tudíž provedení PCR z kultur byla jedinou dostupnou metodou, jak získat sekvence prvoků ze střev švábů.

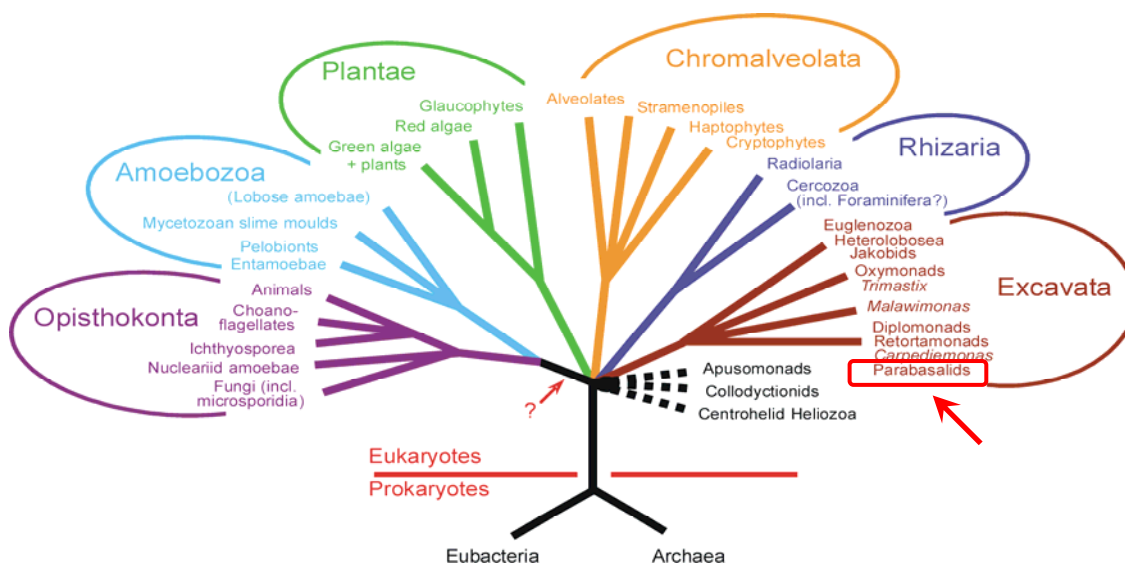
Do dnešního dne jsme získali sekvence SSU rDNA a provedli jsme fylogenetickou analýzu tří z těchto izolátů obsahující trichomonády (Parabasala). Ve všech případech byla sekvence identická, avšak odlišná od sekvencí všech doposud molekulárně charakterizovaných druhů parabasalidů. Nejpříbuznější se jevil druh *Hypotrichomonas acosta*. Na základě těchto výsledků jsme naše izoláty obarvili protargolem a zkoumali jejich morfologii. Potvrdili jsme, že se jedná o nový druh rodu. Kromě toho jsme ve spolupráci s Ivanem Čepičkou studovali dostupné izoláty rodu *Hypotrichomonas* a objevili jsme mezi nimi další dva nové druhy, jejichž částečnou morfologickou studii v naší práci také předkládáme.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Protista a jejich role v evoluci života

Prvoci (Protista) bývají dodnes některými lidmi považováni za pouhou podříši živočichů (Animalia). Toto chápání ale neodpovídá současným poznatkům. Dnes je jasné, že morfologická i molekulární diverzita protist je tak obrovská, že si zaslouží zavedení hned několika samostatných říší (diskuse na toto téma viz Simpson a Roger, 2004). Je také jisté, že Protista jsou parafyletickou skupinou, ze které se hned několikrát nezávisle na sobě vyvinuly mnohobuňčné eukaryotické organizmy (viz obr. 1). Často je pojem prvok laickou veřejností chápán pejorativně; stejně jako pojem bakterie bývá podvědomě spojen s parazitismem a nízkým hygienickým standardem. Čtenář by si ale měl uvědomit, že prvoci nejsou žádnou anomálií přírody, nýbrž představují netušenou a dosud stále nedostatečně prozkoumanou diverzitu životních přístupů, ze které zřejmě několikrát nezávisle na sobě povstal mnohobuněčný život. Mnoho otázek týkajících se fylogeneze eukaryot, a tedy i skupiny Protista, není dosud zodpovězeno. Rádi bychom touto prací přispěli k probíhajícímu výzkumu diverzity a evoluce života. Uvědomujeme si ale, že přidáme pouze jednu kostičku do obrovské skládky evoluce života.

Vzhledem k výše popsaným skutečnostem je velmi obtížné prezentovat ustálený názor na fylogenezi tak rozsáhlé skupiny, jako jsou Protista. V naší práci vycházíme z přednáškového cyklu I. Čepičky, J. Neustupy a V. Hampla – Protistologie (PřF UK, 2005).



Obr. 1. Model evoluce eukaryot s vyznačením skupiny Parabasala. Upraveno podle Simpson a Roger (2004).

2.2. Zažívací trakt švábů a jeho charakteristika

Potrava hmyzu je velmi rozmanitá, díky tomu se u této skupiny neobvykle rozrůžnila i stavba trávicí soustavy. Pokud jde o šváby (Blattodea), jsou to vpravdě polyfágní živočichové. Živí se jak rostlinnou, tak živočišnou potravou, a to jak v tekuté (*Panclora nivea*), tak i v pevné formě. Jejich ústní ústrojí je kousací.

Trávicí trubice hmyzu, a tedy i švábů, se rozděluje do tří oddílů – *stomodeum*, *mesenteron* a *proctodeum*. *Stomodeum* (přední oddíl) je určeno k mechanickému zpracování potravy a připravuje ji na chemické trávení. Skládá se z dutiny ústní, hltanu (*pharynx*), jícnu (*oesophagus*), volete (*ingluvies*) a žvýkacího žaludku (*proventriculus*). *Mesenteron* (střední oddíl) je z funkčního hlediska nejdůležitější částí trávicí soustavy. Dochází zde k chemickému trávení a k vstřebávání živin. Jeho vnitřní povrch je kryt peritrofitickou membránou, vylučovanou speciálními žláznatými buňkami. Tato membrána obaluje pevnou potravu a slouží jako ochrana před průnikem parazitů do tkání. V *mesenteronu* se nachází trubicovitý žaludek, který často obsahuje slepé výběžky (*caeca*). *Mesenteron* obsahuje často i fermentační komory a mycetomy, v nichž žijí symbiotické mikroorganismy pomáhající trávení hůře rozložitelných živin (podle Kodrík, 2004). *Proctodeum* (zadní oddíl) se skládá ze tří částí: *ileum*, *colon* a *rectum*. Na rozhraní *mesenteronu* a *proctodea* ústí do trávicí soustavy Malpighiho trubice, jež mají vylučovací funkci.

Mikroorganismy (Protista a Eubacteria) se vyskytují především v dutinách zadního a středního oddílu trávicí trubice. Přenos mikroorganismů na juvenilní jedince se zřejmě děje cestou fekálně-orální (výkaly kontaminují potravu, jejímž prostřednictvím dojde k vniknutí mikroorganismů do nového hostitele). Kodrík (2004) popisuje také způsob přenosu transovariální cestou, kdy mikroorganismy proniknou z vaječníku do vajíčka nebo embrya ještě před vykladením.

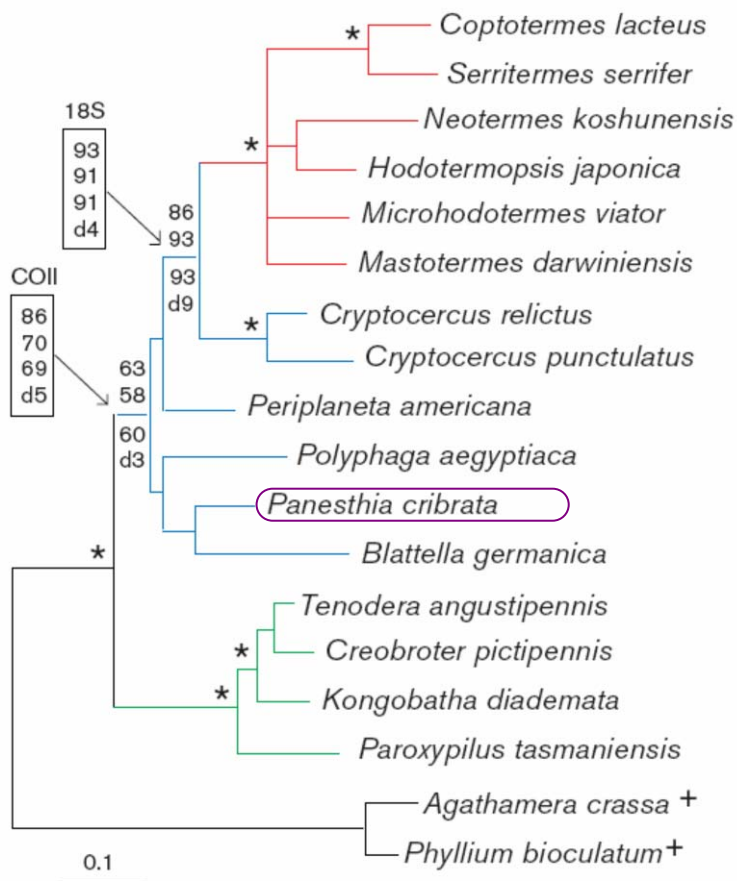
2.3. Protista obývající zažívací trakt švábů

První prvoci ve švábech byli popsáni von Sieboldem v roce 1839 (von Siebold, 1839; in Hoyte, 1961). Von Siebold zkoumal obsah střeva druhu *Blatta orientalis* a pozoroval v něm tři typy prvoků. Šlo jednak o nálevníky, později determinované jako *Nyctotherus ovalis* (Semans, 1943a), dále pak o améboidní organismy, které Semans (1943a; b) přiřadil k druhu *Endamoeba blattae*, a v neposlední řadě také o prvoky druhu *Gregarina blattarum* (Apicomplexa).

Stein (1854) byl patrně prvním badatelem, který prozkoumal obsah střeva i jiného druhu švába než je *Blatta orientalis*, neboť našel nálevníka *Nyctotherus ovalis* i ve vzorku ze švába druhu *Blattella germanica*. Poslední nám známý článek o prvocích ve střevech „nedřevožravých“ švábů publikoval H. M. D. Hoyte (1961). „Dřevožraví“ švábi (např. *Cryptocercus* sp., *Parasphaeria boleiriana*) byli zkoumáni intenzivněji a studie o nich jsou známy i z pozdějších let (viz Hollande a Carruette-Valentin, 1971, Brugerolle, 2003).

Souhrnně lze říci, že do dnešní doby bylo protistology zkoumáno asi dvacet druhů švábů, přičemž pouze v jediném z nich (*Ischnoptera deropeltiformis*) nebyla nalezena žádná protista. Do roku 1961 bylo u jiných než „dřevožravých“ švábů nalezeno celkem 21 rodů prvoků ve 37 druzích. Pravděpodobně se jedná o komenzály nebo parazity. Podobné prvoky má ve svém střevě i „dřevožravý“ šváb *Parasphaeria boleiriana* (Brugerolle *et al.*, 2003) z čeledi Blaberidae (nadčeleď Blaberoidea), jenž zřejmě tráví celulózu stejně jako jeho nedřevožraví příbuzní, tedy pomocí bakterií (spirochéty).

Je zajímavé, že zástupci rodu *Cryptocercus* (Blattodea: Cryptocercidae) mají, podobně jako termiti, ve střevě symbiotické hypermastigidy (skupina „Hypermastigida“ je vysoce polyfyletická) trávící celulózu (viz Hollande a Carruette-Valentin, 1971). Bylo skutečně zjištěno, že termiti (Isoptera) jsou vnitřní skupinou švábů (Blattodea) a nejpříbuznější jim je právě čeleď Cryptocercidae (Lo *et al.* 2000). Tímto problémem se ale v této práci hlouběji nezabýváme.



Obr. 2. Fylogenetický strom skupiny Dictyoptera založený na kombinaci analýzi sekvencí genů SSU rDNA a COII. Zeleně je označen taxon kudlanky (Mantodea), červeně termity (Isoptera) a modře švábi (Blattodea). Fialově zvýrazněn druh *Panesthia cribrata* patřící do čeledi Blaberidae. Podle Lo *et al.* (2000).

V následujících tabulkách se pokusíme obsáhnout dosavadní znalosti o diverzitě prvoků v zaživacím traktu „nedřevožravých“ švábů.

Tab. 1. Dosud prozkoumaní „nedřevožraví“ švábi. Podle Semans (1943a) a Hoyte (1961).

| | Čeď | Druh | Zkratka |
|----|--------------|------------------------------------|------------------|
| 1 | Blaberidae | <i>Blaberus atropos</i> | <i>Blab.atr.</i> |
| 2 | Blaberidae | <i>Blaberus giganteus</i> | <i>Blab.gig.</i> |
| 3 | Blaberidae | <i>Blaberus sp.</i> | <i>Blab.sp.</i> |
| 4 | Blaberidae | <i>Blaptica dubia</i> | <i>Blap.dub.</i> |
| 5 | Blattidae | <i>Blatta orientalis</i> | <i>Blat.or.</i> |
| 6 | Blattidae | <i>Blatta sp.</i> | <i>Blat.sp.</i> |
| 7 | Blattellidae | <i>Blattella germanica</i> | <i>Blat.ger.</i> |
| 8 | Blattellidae | <i>Ectobius lapponicus</i> | <i>Ect.lap.</i> |
| 9 | Blattellidae | <i>Ischnoptera deropeltiformis</i> | <i>Isch.der.</i> |
| 10 | Blaberidae | <i>Panchlora exoleta</i> | <i>Pan.ex.</i> |
| 11 | Blattellidae | <i>Parcoblatta laca</i> | <i>Parc.lac.</i> |
| 12 | Blattellidae | <i>Parcoblatta pensylvanica</i> | <i>Parc.pen.</i> |
| 13 | Blattellidae | <i>Parcoblatta uhleriana</i> | <i>Parc.uhl.</i> |
| 14 | Blattellidae | <i>Parcoblatta virginica</i> | <i>Parc.vir.</i> |
| 15 | Blattidae | <i>Periplaneta americana</i> | <i>Per.am.</i> |
| 16 | Blattidae | <i>Periplaneta australasiae</i> | <i>Per.aus.</i> |

Tab. 2. Prvoci popsaní v zaživacím traktu „nedřevožravých“ švábů. Upraveno dle Semans 1943a; Hoyte 1961.

| | Zařazení | Druh | Autor popisu, rok | Hostitel |
|----|----------------|--|--------------------------|--|
| 1 | Ciliophora | <i>Balantidium blattarum</i> | Ghosh, 1922 | <i>Per.am.</i> |
| 2 | Ciliophora | <i>Balantidium ovatum</i> | Ghosh, 1922 | <i>Per.am.</i> |
| 3 | Ciliophora | <i>Balantidium praenucleatum</i> | Kudo, Meglitsch, 1938 | <i>Blat.or.</i> |
| 4 | Ciliophora | <i>Coelosporidium periplanetae</i> | Lutz, Splendore, 1903 | <i>Blat.ger., Blat.or.</i> |
| 5 | Apicomplexa | <i>Diplocystis schneideri</i> | Kunstler, 1887 | <i>Blat.or., Per.am.</i> |
| 6 | Amoebozoa | <i>Endamoeba blattae</i> | Bütschli, 1878 | <i>Blat.or., Per.am.</i> |
| 7 | Amoebozoa | <i>Endamoeba thompsoni</i> | Lucas, 1927 | <i>Blat.or., Per.am., Blat.ger.</i> |
| 8 | Amoebozoa | <i>Endolimax blattae</i> | Lucas, 1927 | <i>Blat.or., Per.am.</i> |
| 9 | Amoebozoa | <i>Entamoeba dofleini</i> | Epstein, 1941 | <i>Blat.or.</i> |
| 10 | Amoebozoa | <i>Entamoeba hertwigi</i> | Epstein, 1941 | <i>Blat.or.</i> |
| 11 | Amoebozoa | <i>Entamoeba nana</i> | Teiera, 1926 | <i>Blab.atr.</i> |
| 12 | Microspora | <i>Gamocystis tenax</i> | Schneider, 1985 | <i>Ect.lap.</i> |
| 13 | Apicomplexa | <i>Gregarina blattarum</i> | Von Siebold, 1839 | <i>Parc.pen., Blat.ger., Blat.or., Per.am.</i> |
| 14 | Apicomplexa | <i>Gregarina illinensis</i> | Watson, 1915 | <i>Parc.pen.</i> |
| 15 | Apicomplexa | <i>Gregarina legeri</i> | Pinto, 1918 | <i>Per.am.</i> |
| 16 | Apicomplexa | <i>Gregarina ohioensis</i> | Semans, 1939 | <i>Parc.vir.</i> |
| 17 | Apicomplexa | <i>Gregarina panchlorae</i> | Frenzel, 1892 | <i>Panch.ex.</i> |
| 18 | Apicomplexa | <i>Gregarina parcoblattae</i> | Semans, 1939 | <i>Parc.uhl., Parc.pen.</i> |
| 19 | Apicomplexa | <i>Gregarina serpentula</i> | Magalhaes, 1900 | <i>Per.am.</i> |
| 20 | Apicomplexa | <i>Gregarina thomasi</i> | Semans, 1939 | <i>Parc.pen.</i> |
| 21 | Amoebozoa | <i>Hartmanella blattae</i> | Ivanic, 1937 | <i>Blat.or.</i> |
| 22 | Fornicata | <i>Hexamita periplanetae</i> | Bělař, 1916 | <i>Per.am.</i> |
| 23 | Ciliophora | <i>Isotricha caulleryi</i> | Weill, 1929 | <i>Per.am.</i> |
| 24 | Kinetoplastida | <i>Leptomonas blaberae</i> | Tejera, 1926 | <i>Blab.sp.</i> |
| 25 | Kinetoplastida | <i>Leptomonas periplanetae</i> | Laveran, Franchini, 1920 | <i>Blat.or.</i> |
| 26 | Kinetoplastida | <i>Leptomonas sp.</i> | Parisi, 1910 | <i>Parc.vir., Parc.lata,</i> |
| 27 | Parabasala | <i>Lophomonas blattarum</i> | Stein, 1860 | <i>Blat.or., Blat.sp., Per.am.</i> |
| 28 | Parabasala | <i>Lophomonas striata</i> | Bütschli, 1878 | <i>Blat.or., Per.am.,</i> |
| 29 | Parabasala | <i>Monocercomonas orthopterorum</i> | Parisi, 1910 | <i>Ecto.lap., Blat.or.,</i> |
| 30 | Oxymonada | <i>Monocercomonoides orthopterorum</i> | Bělař, 1916 | <i>Blat.or., Per.am., Blab.gig.</i> |
| 31 | Ciliophora | <i>Nyctotherus ovalis</i> | Leidy, 1850 | <i>Blat.ger., Parc.pen., Blat.or., Per.am.</i> |
| 32 | Microspora | <i>Pileocephalus blaberae</i> | Frenzel, 1892 | <i>Blap.dub.</i> |
| 33 | Microspora | <i>Plistophora periplanetae</i> | Lutz, Splendore, 1903 | <i>Blat.ger., Blat.or., Per.am.</i> |
| 34 | Microspora | <i>Plistophora sp.</i> | | <i>Blat.or.</i> |
| 35 | Fornicata | <i>Retortamonas blattae</i> | Bishop, 1931 | <i>Blat.or.</i> |
| 36 | Parabasala | <i>Tetratrichomastix blattidarum</i> | Young, 1935 | <i>Blat.or., Per.am., Blat.ger.</i> |
| 37 | Fornicata | <i>Trimitus blattae</i> | Grassé, 1952 | <i>Blat.or.</i> |

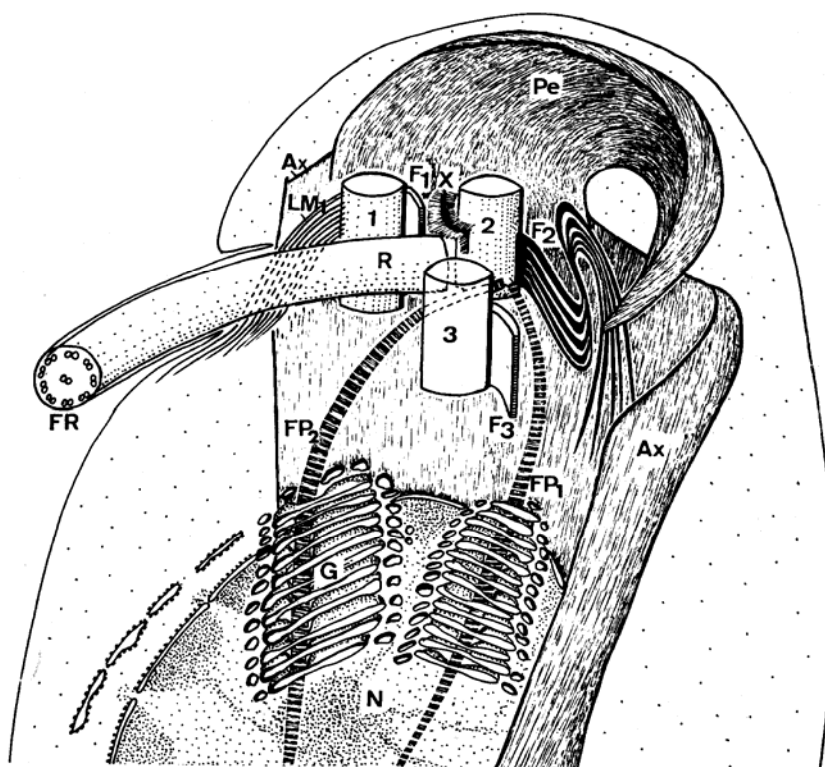
2.4 Charakteristika kmene Parabasala

Parabasala jsou ve většině současných systémů chápána jako monofyletický taxon na úrovni kmene. Řadí se do skupiny Metamonada, do níž v současnosti (podle Cavalier-Smith 2003, Hampl *et al.*, 2005) přiřazujeme kromě parabasalidů ještě některé další anaerobní bičíkovce (diplomonády, enteromonády, retortamonády, *Carpediemonas*, oxymonády, *Trimastix*). Skupina Metamonada je zřejmě monofyletická (Hampl *et al.*, 2005), avšak její definice je velmi obtížná, neboť její zástupci jsou neobvykle různorodí. Skupina Metamonada se vyznačuje anaerobním způsobem života, žádní její příslušníci nemají typicky vyvinutou mitochondrii. Přítomny jsou pouze její anaerobní deriváty, tj. hydrogenozomy (Parabasala) nebo mitozomy (*Giardia*). Většina druhů metamonád žije endobioticky (paraziti, komenzálové a endosymbionti).

Skupinu Metamonada pak někteří autoři (viz diskuse v Hampl *et al.*, 2005) řadí spolu se skupinami Heterolobosea, Euglenozoa a s několika malými skupinami bičíkovců do skupiny Excavata. Není úplně jasné, zda skupina Excavata představuje monofyletický taxon. Za primární znak skupiny Excavata je považována břišní rýha, kterou obvykle prochází jeden bičík (Simpson a Patterson, 1999). Dalším typickým znakem této skupiny je charakteristické uspořádání mastigontu (tedy bazálních tělísek bičíků a přidrženého cytoskeletu) a mikrotubulárního cytoskeletu. Excavata jsou většinou fagotrofové, u skupiny Euglenoidea jsou dokonce přítomny plastidy, v nichž probíhá fotosyntéza.

Věnujme se nyní skupině Parabasala, která je největší skupinou patřící mezi Metamonada. Podle klasického modelu evoluce mají parabasalidi v základním stavu čtyři bičíky, z toho je jeden zpětný. Existuje předpoklad, že společný předek dnes známých parabasalidů byl mnohobičíkatý, tj. byl to příslušník taxonu *Hypermastigida* (viz Gerbod *et al.*, 2004). Během fylogeneze pak podle obou těchto modelů docházelo určitým způsobem ke změnám počtu a uspořádání bičíků a dalších buněčných struktur.

Parabasalidi mají několik zvláštních struktur, které jsou uznávány jako významné taxonomické znaky a na jejich struktuře záleží také morfologické určení průběhu evoluce (viz Brugerolle, 1976; 1986).

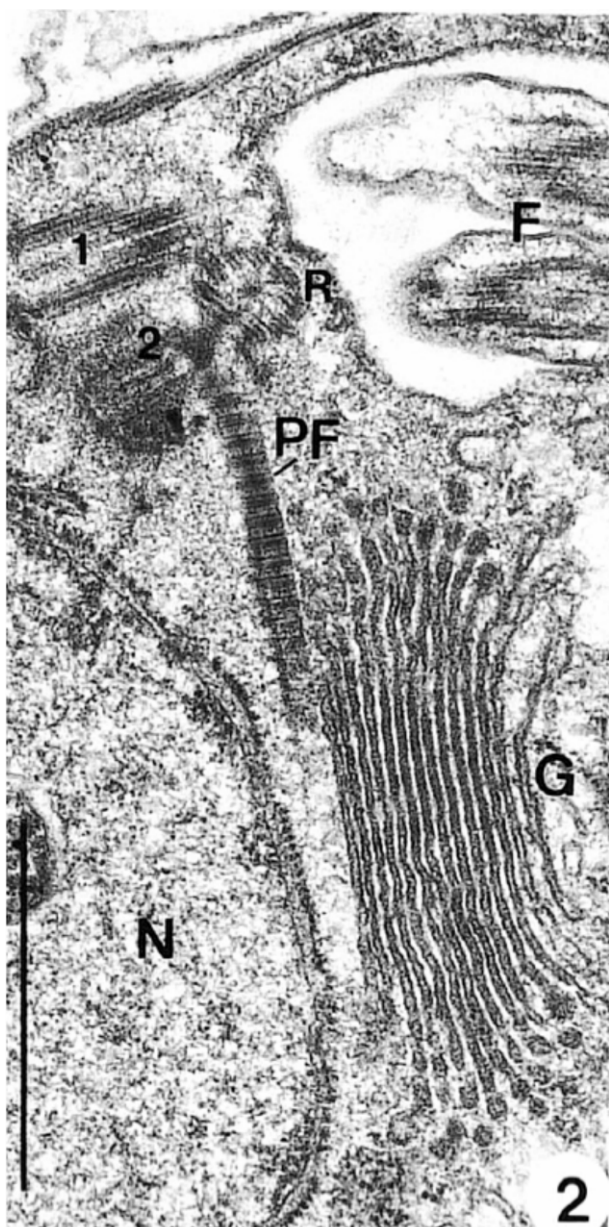


Obr. 3. Schématický náčrt parabasalida vystihující polohu taxonomicky významných struktur. 1, 2, 3, R – bazální tělíska; Ax – axostyl; F1, F2, F3 – kořenové fibrily bazálních tělísek; FP1, FP2 – parabazální fibrily; FR – zpětný bičík; G – Golgiho komplex; LM1 – marginální lamela; MO – undulující membrána; N – jádro; Pe – pelta; X – struktura X. Podle Brugerolle, 1976.

Charakteristická je zejména přítomnost **parabasálního aparátu** (viz obr. 3.), což je mohutně vyvinutý Golgiho komplex navázaný obvykle na dvě žíhané fibrily vybíhající z mastigontu (parabasální fibrily) a fixující Golgiho komplex v blízkosti jádra (viz obr. 4.). Ve světelném mikroskopu se Golgiho komplex jeví jako tzv. parabazální tělísko. Tvar parabazálního tělíska (disk, tyč, tvar písmene V apod.) je důležitý diagnostický rodový znak.

Typické je také uspořádání **mastigontu** (tj. bičíkového aparátu). Mastigont se skládá z bazálních tělísek bičíků, vlastních bičíků a podpůrného cytoskeletu. Jediný zcela bezbičíkatý rod je *Dientamoeba* (Camp *et al.*, 1974). Skupina bazálních tělísek zaujímá u parabasalidů vždy podobné postavení. Typicky jsou vyvinuty tři nebo čtyři přední, tažné bičíky a jeden zpětný, vlečný bičík. Bazální tělísko zpětného bičíku je zpravidla kolmé na bazální tělíska předních. Bazální tělíska předních bičíků (původně zřejmě tři, sekundárně až několik tisíc) jsou rovnoběžná.

Dále je u kmene Parabasala charakteristická přítomnost mikrotubulárního **pelto-axostylárního komplexu**. Pelta i axostyl mají podobu stočených mikrotubulárních ploch. Axostyl objímá jádro, vyztužuje osu buňky a jeho konec vyčnívá mimo tělo buňky. Axostyl není na rozdíl od oxymonád kontraktilní. Pelta kryje jádro a mastigont. Pelto-axostylární komplex je vyvinut u všech zástupců řádu Trichomonadida kromě rodu *Dientamoeba*.



Obr. 4. Fotografie *Monocercomonas lacertae* z transmisního elektronového mikroskopu. 1, 2, R – basální tělíska; F – bičík; G – Golgiho komplex; N – jádro; PF – parabasální fibrila. Měřítko představuje 1 μm . Podle Brugerolle, 1994.

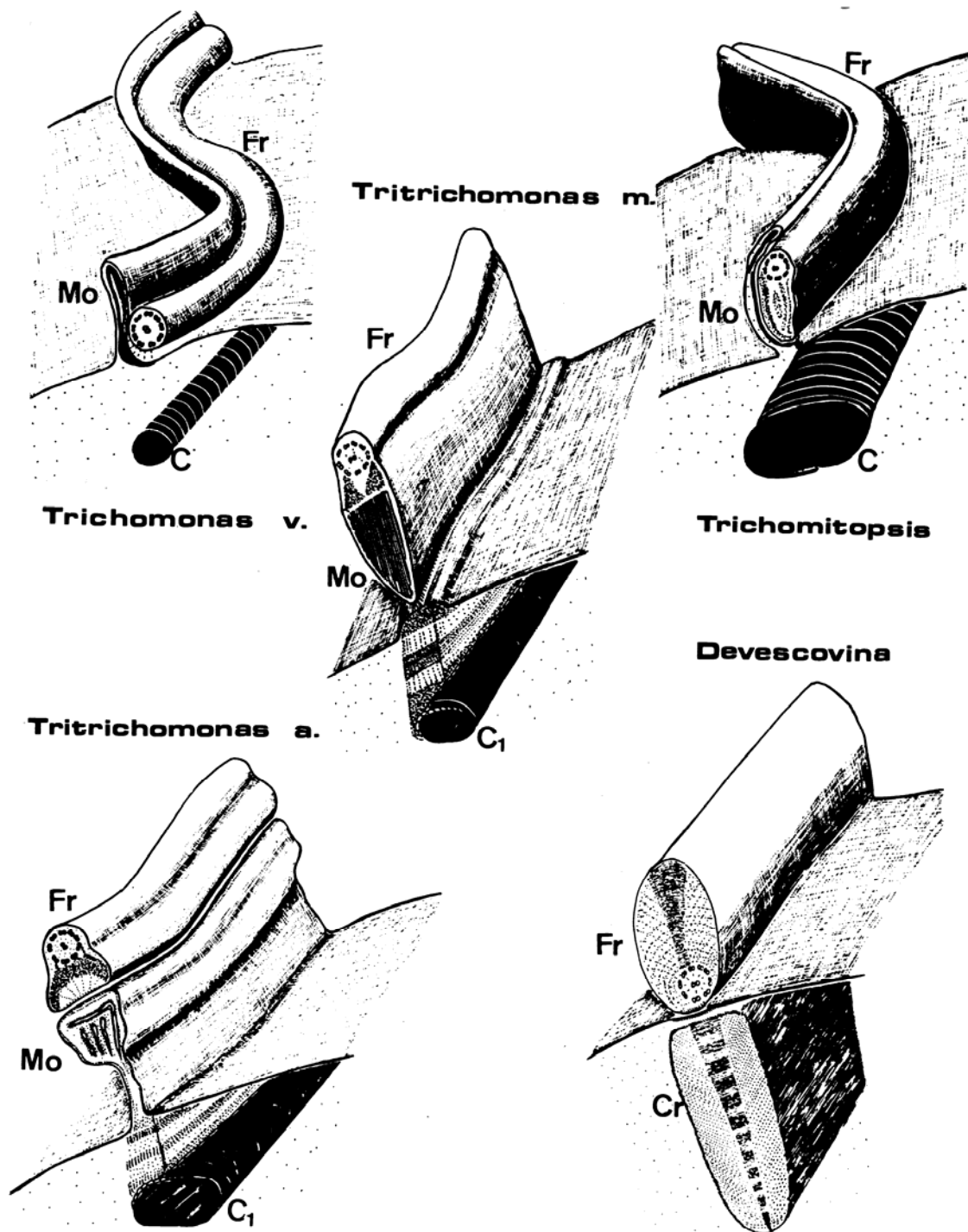
Pro parabasalidy je také typický zvláštní typ mitózy - uzavřená pleuromitóza s extranukleárním dělicím vřeténkem (Hollande a Carruette-Valentin, 1971; Brugerolle, 1976).

Nesmíme zapomínat ani na přítomnost **hydrogenosomů** (viz Přílohy - obr. 29). Jedná se o specifický typ buněčných organel, které jsou zřejmě homologické mitochondriím a fungují v anaerobním prostředí. U kmene Parabasala jsou charakteristickou organelou, ale vyskytují se i u jiných prvoků (*Nyctotherus*, *Plagiopyla*, *Neocallimastix* aj.). Zatímco v hydrogenosomu nálevníka rodu *Nyctotherus* byl objeven genom s mitochondriálními znaky (Akhmanova,

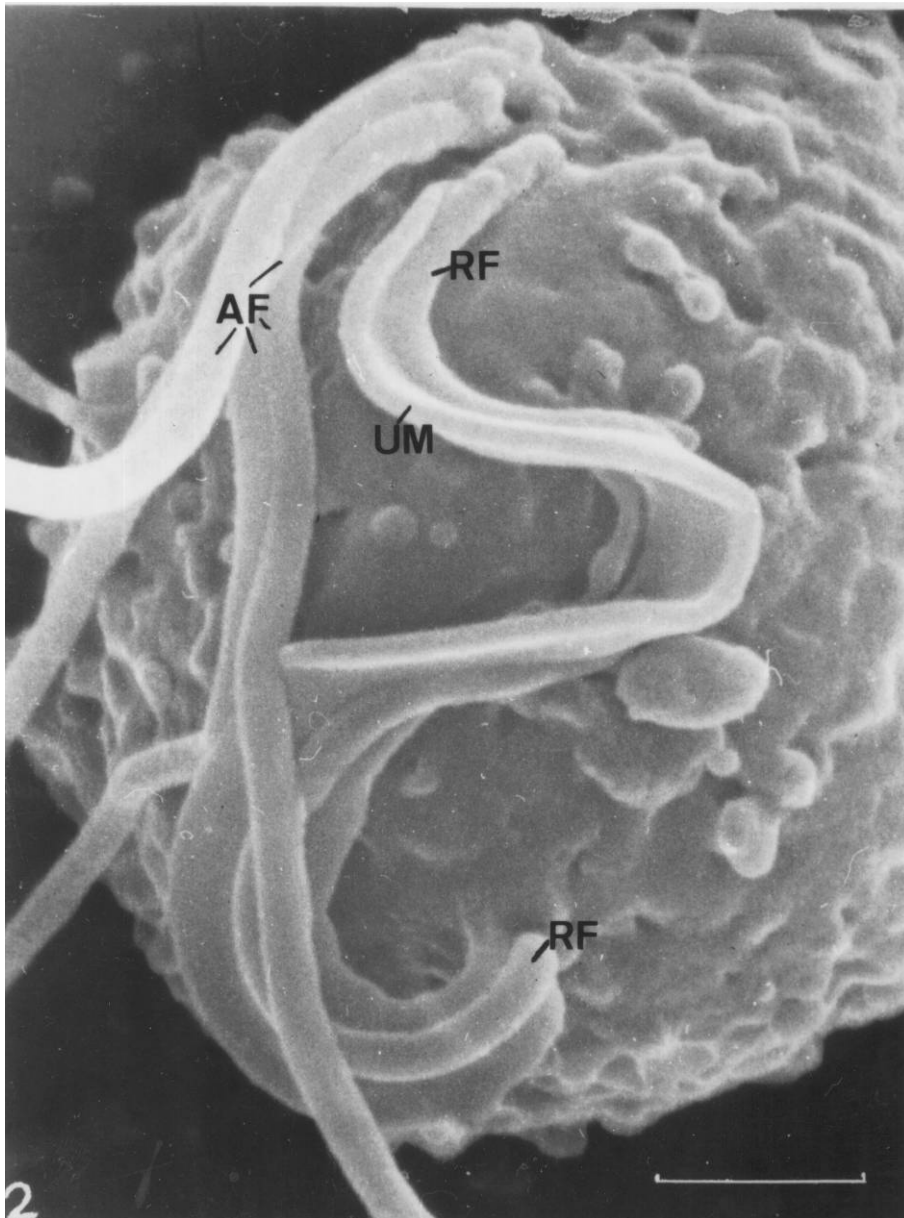
et al., 1998; Boxma *et al.*, 2005), hydrogenosom trichomonád genom nemá (Turner a Müller, 1983).

Pro klasifikaci v rámci kmene Parabasala jsou nesmírně důležité ještě kosta a undulující membrána. **Undulující membrána** (viz obr. 6) je charakteristická struktura přítomná u mnoha zástupců tohoto kmene. Bylo popsáno několik jejích typů, od jednoduchého cytoplazmatického lemu, na nějž je asociován zpětný bičík (*Hypotrichomonas*, *Trichomitus*, *Trichomonas*), až po membránu značně složitější stavby (*Tritrichomonas*) (viz obr. 5). Undulující membrána může být různě dlouhá, obvykle dosahuje konce buňky. U mnohých zástupců je undulující membrána podložena žíhanou fibrilou, **kostou** (viz obr. 5). Podle typu žíhání rozeznáváme dva typy kosty, oba typy se skládají ze stejných proteinů (Viscogliosi a Brugerolle, 1994). Typ A (*Tritrichomonas*, *Trichomitus*) má stejné žíhání jako parabasální fibrily, typ B (*Trichomonadidae*) se od nich svým žíháním liší.

Zástupci kmene Parabasala žijí většinou jako střevní komenzálové nebo symbionti bezobratlých i obratlovců. Některé druhy (např. *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, *Histomonas meleagridis*) jsou pro své hostitele patogenní. Jsou známy pouze tři volně žijící druhy (*Pseudotrichomonas keilini*, *Ditrichomonas honigbergi*, *Monotrichomonas carabina*). Všichni tito volně žijící parabasalidi obývají anaerobní vodní prostředí.



Obr. 5. Typy undulujících membrán u kmene Parabasala. C, C₁ – kosta; Cr – kresta; Mo – undulující membrána; Fr – zpětný bičík. Podle Brugerolle, 1976.



Obr. 6. Fotografie lameliformní undulující membrány *Trichomonas vaginalis* ze scanovacího elektronového mikroskopu. AF – přední bičíky; RF – zpětný bičík; UM – undulující membrána. Fotografie zapůjčena prof. Kuldou, publikována v Kulda *et al.* (1986).

2.5. Systém kmene Parabasala

Systém kmene Parabasala, který předkládáme níže, je sestaven podle Brugerolle a Lee (2002), doplněn o revize Brugerolle (2001), Brugerolle a Bordereau (2004) a Hampl *et al.* (2006). Tento systém jsme vypracovali se značným přispěním I. Čepičky. Jde o nejaktuálnější a velmi podrobné shrnutí systematiky celého kmene Parabasala.

1. Řád TRICHOMONADIDA*

1. Čeleď Monocercomonadidae*

1. Podčeleď Monocercomonadinae*

*Monocercomonas** Grassi, 1879; *Tricercomitus* Kirby, 1930; *Tetratrichomastix* Mackinnon, 1913; *Hexamastix* Alexeieff, 1912

2. Podčeleď Chilomitinae

Chilomitus Da Fonseca, 1915

3. Podčeleď Protrichomonadinae

Protrichomonas Alexeieff, 1910; *Histomonas* Tyzzer, 1920; *Parahistomonas* Honigberg and Kuldová, 1969

4. Podčeleď Dientamoebinae

Dientamoeba Jepps and Dobell, 1918

5. Podčeleď Hypotrichomonadinae*

Hypotrichomonas Lee, 1960; *Pseudotrichomonas* Bishop, 1939; *Ditrichomonas* Farmer, 1993; *Monotrichomonas* Bernard, Simpson et Patterson, 2000

2. Čeleď Trichomitidae

Trichomitus Swezy, 1915

3. Čeleď Trichomonadidae

Trichomonas Donné, 1836; *Tetratrichomonas* Parisi, 1910; *Pentatrichomonas* Mesnil, 1914; *Trichomonoides* Brugerolle et Bordereau, 2004 *Trichomitopsis* Kofoid et Swezy, 1919

Pseudotrypanosoma Grassi, 1917; *Pentatrichomonoides* Kirby, 1931;

Cochlosoma Kotlán, 1923

4. Čeleď Tritrichomonadidae

Tritrichomonas Kofoid, 1920

2. Řád CRISTAMONADIDA

1. Čeleď Devescovinidae*

1. Podčeleď Devescovininae*

* Hvězdička značí parafyletický nebo polyfyletický taxon

Devescovina Foà, 1905; *Foaina* Janicki, 1915; *Parajoenia* Janicki, 1911; *Caduceia*, Frana, 1918; *Paradevescovina* Kirby, 1926; *Metadevescovina*, Light, 1926; *Pseudodevescovina* Sutherland, 1933; *Hyperdevescovina* Kirby, 1947; *Crucinympa* Kirby, 1938; *Bullanympa* Kirby, 1938; *Mixotricha* Sutherland, 1933; *Polymastigoides* Grassé et Hollande, 1951; *Kirbynia* Grassé et Hollande, 1950; *Achemon* Grassé et Hollande, 1950; *Astronympa* Grassé 1952; *Evemonia* Grassé et Hollande, 1950

2. Podčeleď Gigantomonadinae

Gigantomonas Dogiel, 1916; *Macrotrichomonas* Grassi, 1917

2. Čeleď Calonymphidae*

Calonympha Foà*, 1905; *Stephanonympha* Janicki, 1911; *Snyderella* Kirby, 1929; *Coronympha* Kirby, 1929; *Metacoronympha* Kirby, 1939; *Diplonympha* Grassi, 1917; *Gyronympha* Dolan et Kirby, 2002; *Prosnyderella* Dolan et Kirby, 2002; *Criconympha* Dolan et Kirby, 2002

3. Čeleď Joeniidae†

Joenia Grassi, 1917; *Placojoenia* Radek et Hausmann, 1994; *Joenina* Grassi, 1885; *Joenoides* Grassé, 1952; *Joenopsis* Cutler, 1920; *Cyclojoenia* Nurse, 1945; *Projoenia* Lavette, 1970; *Pachyjoenia* Brugerolle et Bordereau, 2005

4. Čeleď Lophomonadidae†

Lophomonas Stein, 1860

5. Čeleď Deltotrichonymphidae†

Deltotrichonympha Sutherland, 1933; *Koruga* Claveland, 1966

6. Čeleď Rhizonymphidae†

Rhizonympha Grassé et Hollande, 1951

7. Čeleď Kofoidiidae†

Kofoidia Light, 1927

† Dříve řazeno do taxonu Hypermastigida

3. Řád TRICHONYMPHIDA[†]

1. Čeled' Hoplonymphidae[†]

Hoplonympha Light, 1926; *Barbulanympha* Cleveland, Hall, Sanders et Collier, 1934;
Urinympha Cleveland, Hall, Sanders et Collier, 1934; *Rhynchonympha* Cleveland,
Hall, Sanders et Collier, 1934

2. Čeled' Staurojoeninidae[†]

Staurojoenina Kirby, 1926; *Idionympha* Cleveland, Hall, Sanders et Collier, 1934

3. Čeled' Trichonymphidae[†]

Trichonympha Leidy, 1877

4. Čeled' Eucomonymphidae*[†]

Eucomonympha Cleveland, Hall, Sanders et Collier, 1934; *Pseudotrichonympha*
Grassi et Foà, 1911

5. Čeled' Teranymphidae[†]

Teranympha Koidzumi, 1917

6. Čeled' Spirotrichosomidae[†]

Spirotrichosoma Sutherland, 1933; *Macrospironympha* Cleveland, Hall, Sanders et
Collier, 1934; *Leptospironympha* Cleveland, Hall, Sanders et Collier, 1934;
Apospironympha Cleveland et Day, 1958; *Colospironympha* Cleveland et Day, 1958

4. Řád SPIROTRICHONYMPHIDA[†]

1. Čeled' Spirotrichonymphidae[†]

Spirotrichonympha Grassi et Foà, 1911; *Micromastigotes* Hollande et
Carruette-Valentin, 1971; *Spirotrichonymphella* Grassi, 1917; *Spironympha*
Koidzumi, 1921

2. Čeled' Holomastigotoididae[†]

Holomastigotoides Grassi et Foà, 1911; *Rostronympha* Duboscq, Grassé et Rose, 1937

3. Čeleď Holomastigotidae[†]

Holomastigotes Grassi, 1892; *Spiromastigotes* Duboscq *et* Grassé, 1943

4. Čeleď Microjoeniidae[†]

Microjoenia Grassi, 1892

2.6. Evoluce skupiny Parabasala

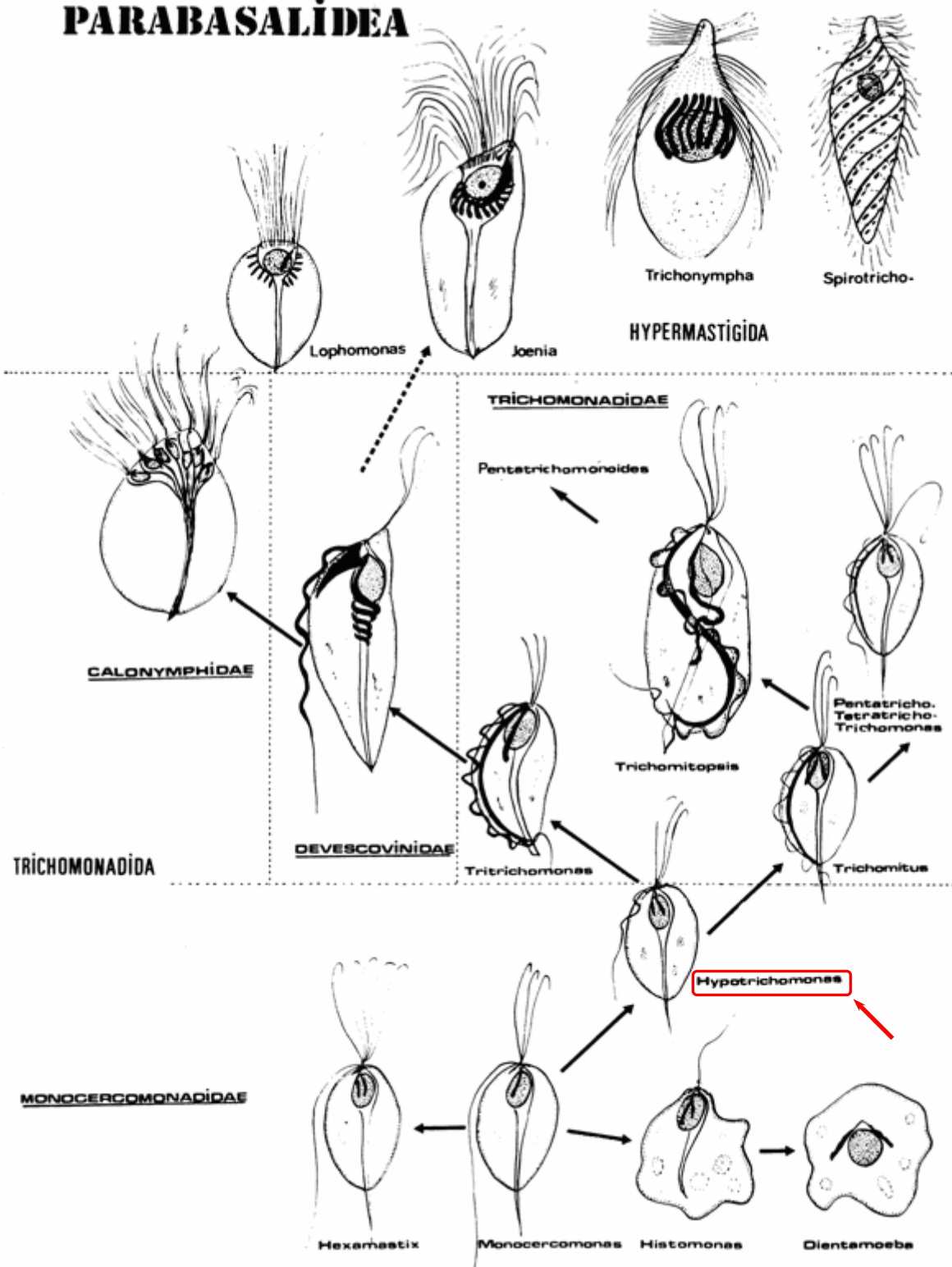
Až do nedávné doby se na základě výsledků morfologických studií předpokládalo, že čeleď Monocercomonadidae má v řádu Trichomonadida, stejně jako v celém kmeni Parabasala, bazální postavení, neboť do ní byli řazeni prvoci, kteří buď undulující membránu nemají vytvořenu vůbec, nebo jim chybí vyvinutá kosta (viz obr. 7) (Honigberg, 1963; Brugerolle, 1976; 1986). Její podčeleď Hypotrichomonadinae s undulující membránou, která však není podložena kostou, byla vnímána jako přechod od monocerkomonád k „pravým“ trichomonádám (tehdejší čeleď Trichomonadidae) s undulující membránou i kostou. Dalšími modifikacemi a zesložitováním stavby měly z trichomonád vzniknout čeledi Devescovinidae a Calonymphidae. Vrcholem vývoje měla být skupina Hypermastigida s obřími mnohobíčíkatými buňkami.

Fylogenetické studie tento pohled doslova rozcupovaly (diskuse o tomto tématu např. Hampl *et al.*, 2004), (viz obr. 8). Čeleď Monocercomonadidae je z tohoto úhlu pohledu polyfyletická a ani jedna její linie nepředstavuje původní typ parabasalidů. Její podčeleď Hypotrichomonadinae je také polyfyletická, neboť endosymbiotický rod *Hypotrichomonas* není podle porovnání sekvencí SSU rDNA blíže příbuzný volně žijícím rodům *Monotrichomonas*, *Ditrichomonas* a *Pseudotrichomonas*. Navíc u všech zástupců čeledi Monocercomonadidae, tedy i u Hypotrichomonadinae, došlo k sekundárnímu zániku kosty a většinou též undulující membrány (neukazují nám „předkostální“ dobu, jak což chybně vyjadřoval klasický model evoluce podle morfologických znaků). Čeleď Trichomonadidae (parabasalidi s undulující membránou a kostou) se ukázala být polyfyletická a byla rozdělena na čeledi Trichomonadidae, Tritrichomonadidae a Trichomitidae (Hampl *et al.*, 2006). Polyfyletická je též skupina Hypermastigida. Její morfologie, tj. mnohobíčíkatost a zároveň jednojadernost, vznikla nejméně třikrát nezávisle na sobě (řády Trichonymphida a Spirotrichonymphida, část řádu Cristamonadida) a pojem Hypermastigida přestal být používán.

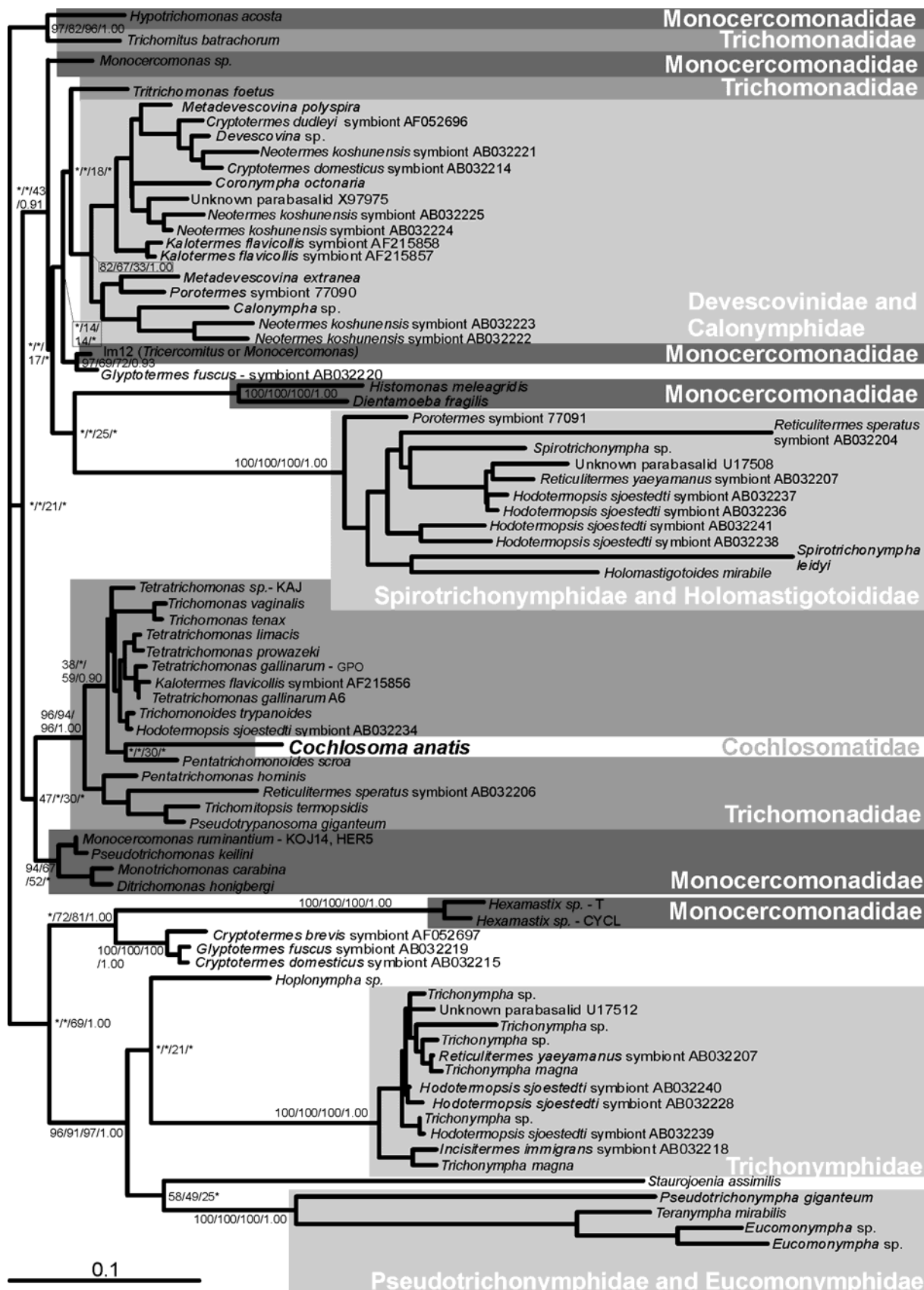
Dále zůstává otázkou, jak vypadal společný předek dnes známých parabasalidů. Nejpravděpodobněji se dnes jeví dvě hypotézy. Podle té první šlo o poměrně jednoduchý organismus typu Trichomonadidae, Tritrichomonadidae nebo Trichomitidae, tj. typického

příslušníka řádu Trichomonadida s kostou a undulující membránou (v tomto případě by obě struktury vznikly pouze jednou). Podle druhé hypotézy byl předkem organismus podobný řádu Trichonymphida, tj. organismus se složitou stavbou a obřími buňkami. První hypotéza se zdá být na první pohled přijatelnější, neboť je těžké si představit, jak se ze složitěho organismu typu *Trichonympha* vyvine organismus s relativně jednoduchou morfologií typu *Trichomonas*, a přitom zůstanou zachovány klasické znaky kmene Parabasala. Fylogenetické analýzy založené na více genech však mírně favorizují druhou hypotézu, tedy bazální pozici trichonymfidů (Gerbod *et al.* 2004). Protože byl však u některých skupin, zřejmě včetně řádu Trichonymphida, prokázán artefakt přitahování dlouhých větví, LBA, (Hampl *et al.*, 2004), zůstává otázka předka kmene Parabasala nadále otevřená a nezodpovězená.

PARABASALIDEA



Obr. 7. Klasická představa evoluce skupiny Parabasala podle morfologických znaků. Upraveno podle Brugerolle, 1986a. Zvýrazněn rod *Hypotrichomonas*.



Obr. 8. Nezakořeněný fylogenetický strom kmene Parabasala založený na srovnání sekvencí SSU rDNA. Strom byl sestaven metodou maximum likelihood pod modelem TrN + I + Γ. Čísla v uzlech jsou hodnoty: distance bootstrap/bootstrapped MP/ bootstrap ML/ Bayesian posterior probability. Převzato z Hampl *et al.*, 2006.

2.7. Rod *Hypotrichomonas*

U rodu *Hypotrichomonas* je vyvinuta hřebenovitá struktura a zřejmě i základ kosty typu A, tzv. rudimentární kosta (Mattern *et al.*, 1969). U ostatních rodů podčeledi Hypotrichomonadinae tyto struktury chybí (Brugerolle, 1991; Farmer, 1993).

Již Kulda (1965) upozornil na podobnost rodu *Hypotrichomonas* s rodem *Trichomitus*, kterou v poslední době prokazují i metody molekulární taxonomie. Pouhou nepřítomnost kosty Kulda nepovažoval za dostatečný důvod k řazení rodu *Hypotrichomonas* do čeledi Monocercomonadidae a navrhl ho přiřadit do čeledi Trichomonadidae. Molekulární taxonomie později potvrdila Kuldovu tezi o blízké příbuznosti rodů *Trichomitus* a *Hypotrichomonas*, ale zároveň s tím zpochybnila monofyletický původ čeledi Monocercomonadidae.

Hypotrichomonas má vyvinuty tři přední (anteriorní) bičíky a jeden zpětný. Zpětný bičík přiléhá na bázi výběžku cytoplasmy, čímž vzniká undulující membrána lamelifornního typu. Zpětný bičík pokračuje po ukončení undulující membrány jako volný vlečný bičík (viz obr. 9,10).

Kosta je značně redukována (Mattern *et al.*, 1969). Kapitulum axostylu je lžícovité a objímá jádro. Na kapitulum axostylu anteriorně nasedá dobře vyvinutá srpkovitá pelta.

Jediným řádně popsaným druhem rodu *Hypotrichomonas* je druh *Hypotrichomonas acosta*. Poprvé jej pozoroval Das Gupta (1936) v hroznýši královském (*Boa constrictor*) a v užovce indigové (*Drymarchon corais*), označil jej tehdy za *Trichomonas* sp. Popsal jej ale až Moskowitz (1951) jako *Trichomonas acosta*. Do zvláštního druhu jej přeřadil Lee (1960).

Od založení rodu byl popsán ještě druh *Hypotrichomonas avium*, který izoloval a popsál Navaratham (1970) z křepelky asámské (*Cryptoplectron erythrorhynchum*), popis ale provedl na preparátech barvených nevhodnou metodou, proto tento druh nepovažujeme za validní.

2.7.1. *Hypotrichomonas acosta* (Lee, 1960)

Jak jsme již uvedli, byl tento druh popsán nejprve jako *Trichomonas acosta* (Moskowitz, 1951). Lee (1960) se rozhodl překlasifikovat *Trichomonas acosta* a vytvořil pro něj nový rod *Hypotrichomonas* s jediným známým druhem *Hypotrichomonas acosta*.

Honigberg (1963) později sestavil hypotézu fylogeneze kmenu Parabasala, podle níž měl hrát druh *Trichomonas acosta* důležitou roli v evoluci řádu Trichomonadida, stejně jako celého kmene Parabasala. Tuto hypotézu nazýváme klasickým modelem.

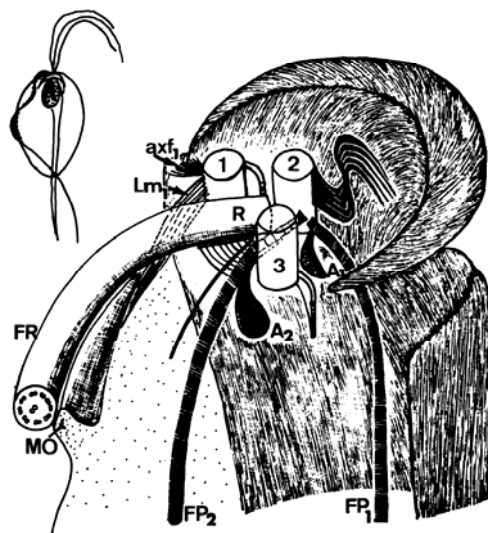
Hostitelé

Typovým hostitelem je hroznýš královský (*Boa constrictor*). Dalšími hostiteli jsou pak blavor žlutý (*Ophisaurus apodus*), korovec mexický (*Heloderma horridum*), korovec jedovatý (*Heloderma suspectum*), varan skvrnitý (*Varanus salvator*), psohlavec zelený (*Corallus caninus*), hroznýšek turecký (*Eryx jaculus*), *Eunectes murina*, úžovka mississipská (*Natrix cyclopion* f. *floridana*), úžovky *N. rhombifera* f. *rhombifera*, *N. sipedon* f. *pictiventris*, *N. sipedon* f. *sipedon* a *N. taxispilota*, úžovka prožkovaná (*Thamnophis sirtalis* f. *sirtalis*), heterodon obecný (*Heterodon platyrhinos*), štíhlovka americká (*Coluber constrictor* f. *constrictor*), úžovka indigová (*Drymarchon corais*), *D. corais couperi*, úžovka červená (*Elaphe guttata*), úžovka černá (*E. obsoleta* f. *obsoleta*), *E. obsoleta* f. *quadrivittata*, úžovka býčí (*Pituophis melanoleucus* f. *melanoleucus*), korálovka préríjní (*Lampropeltis calligaster*), korálovka pruhovaná (*Lampropeltis getulus* f. *triangulum*) aj. Je zajímavé, že doposud byl druh *H. acosta* nalezen pouze v exotických plazech. Kulda (1961) ho sice neobjevil v našich plazech, ale dokázal je však tímto druhem nakazit.

Popis druhu

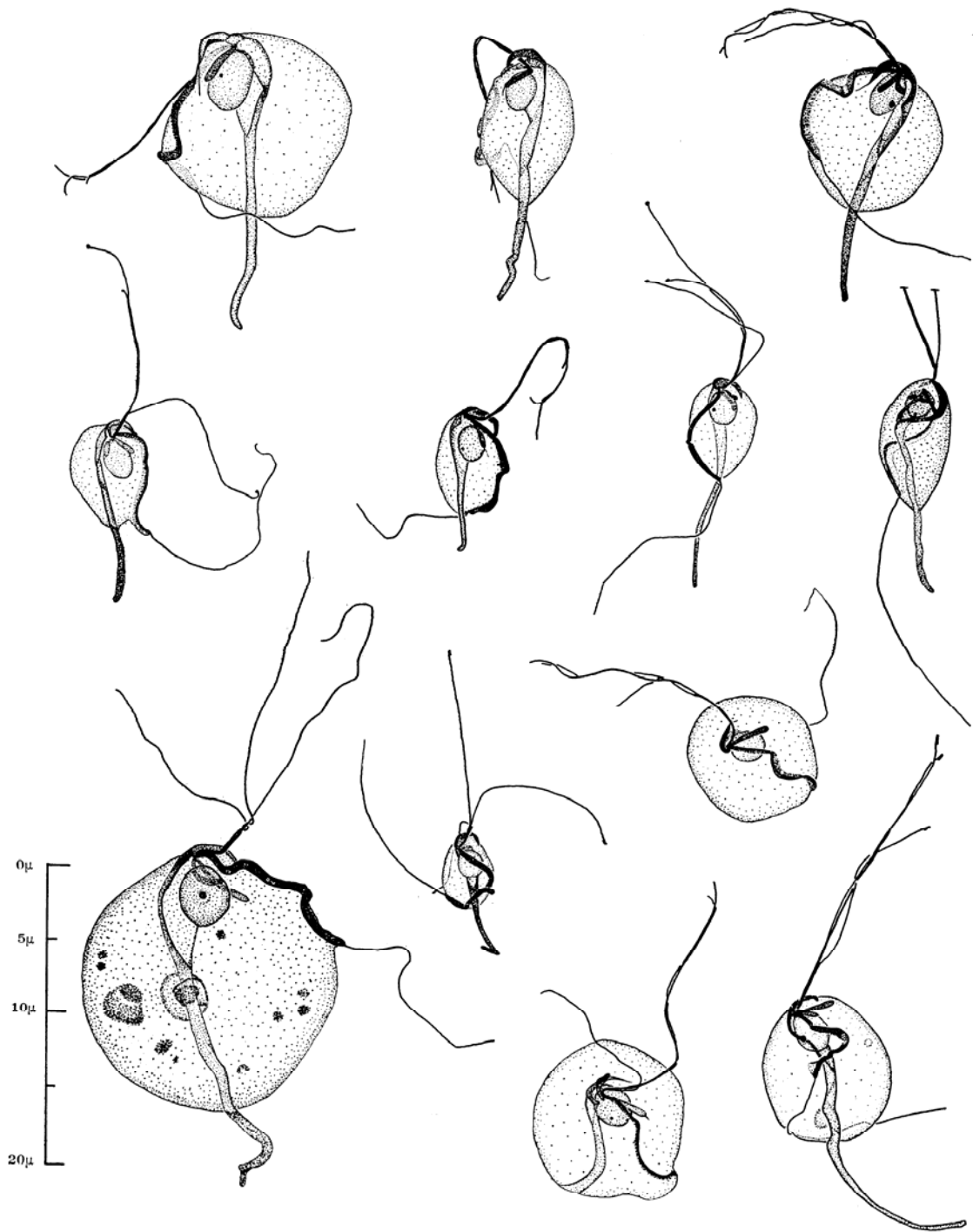
Kmen axostylu je relativně široký (hyalinní), často je více či méně zkroucený a jeho distální konec se postupně zužuje. Parabasální aparát se skládá z parabasálního tělíska tvaru písmene V a dvou parabasálních fibril.

H. acosta je značně variabilním druhem, a to i v rámci jediné populace. Průměrná délka buňky je 7,3 μm a šířka je 4,8 μm . Jsou známí i obří jedinci (jejichž délka je cca 50 μm), u kterých se objevuje kanibalismus. Bičíky jsou zpravidla různě dlouhé. Průměrná délka nejdelšího anteriorního bičíku je 14,2 μm . Undulující membrána je velice rozmanitá ve své délce i vyvinutí.



Obr. 9.

Ultrastruktura *Hypotrichomonas acosta*. 1, 2, 3, R – basální tělíska; A1, A2 – atraktofore; Ax – axostyl; Axfl – přídatná fibrila k basálnímu tělísku 1. FR – zpětný bičík; Lm – marginální lamela; MO – undulující membrána; FP1, FP2 – parabasální fibrily; Pe – pelta. Podle Brugerolle, 1976.



Obr. 10. *Hypotrichomonas acosta*. Podle Lee, 1960.

2.7.2. Další známé sekvence přiřazované rodu *Hypotrichomonas*

Dosud bylo osekvenováno několik dalších organismů, jejichž sekvence SSU rDNA jsou podobné druhu *Hypotrichomonas acosta*. Bohužel však nebyly tyto organismy dodnes kultivovány ani pozorovány. Nevíme proto, jestli jde skutečně o další druhy tohoto rodu. Potenciální nové druhy rodu *Hypotrichomonas* byly získány z obsahu střeva brouka *Odontotaenius disjunctus* (Passalidae) (Zhang *et al.* 2003).

V této práci předkládáme a analyzujeme kromě našich izolátů z *Blaberus craniifer* symbiont BCR1, *Blaberus* sp. symbiont BSP1, *Blaberus atropos* symbiont BAT1 a *Archimandrita tessellata* symbiont ARCH1 ještě další, dosud nepublikované sekvence izolátů PRA z prasete domácího (*Sus scrofa* f. *domestica*), CYCL2 z leguána *Cyclura nubila*, LEP1 z žáby *Leptopeltis* sp. a CORAL1 z hada *Corallus hortulanus*, které nám poskytl I. Čepička k analýze a vyhodnocení.

MATERIÁL A METODY

3.1. Izolace a kultivace prvoků

Prvky jsme získali pitvou mesenteronu a proctodea švábů. Celkově jsme takto vyšetřili 15 jedinců náležících do deseti druhů švábů nadčeledi Blaberoidea, jmenovitě *Archimandrita tessellata*, *Blaberus atropos*, *Blaberus craniifer*, *Blaberus giganteus*, *Blaberus* sp., *Byrsotria fumigata*, *Ergaula capucina*, *Gromphadorhina portentosa*, *Panchlora nivea* a *Rhyparobia maderae*.

Obsah střeva byl nejčastěji odebírán do zkumavky s médiem podle Dobell-Leidlaw a následně kultivován při pokojové teplotě. Střevní obsah byl v některých případech odebírán do plastických zkumavek či mikrozkušavek bez média a byl použit přímo k izolaci DNA.

Kmeny udržované na médiu Dobell-Leidlaw při pokojové teplotě (cca 24 °C) jsme pomocí sterilních Pasteurových pipet přeočkovávali jednou za 4 až 6 dní. Některé kultury jsme se pokusili pěstovat i ve 37 °C. Médium podle Dobell-Leidlaw poskytuje vhodné prostředí pro pěstování polyxenických kultur střevních prvoků (tj. jsou přítomny i nespecifikované druhy jiných mikroorganismů, především bakterií).

3.1.1. Složení média podle Dobell-Leidlaw (Dobell a Leidlaw, 1926)

Použité chemikálie:

- KCl
- NaCl
- NaHCO₃
- NaH₂PO₄ · H₂O
- CaCl₂ · 2 H₂O
- koňské sérum

Médium se skládá z pevné a tekuté složky. Obě složky se připravují odděleně a médium je zkompletováno bezprostředně před použitím. **Pevnou složku** představuje 1,5 ml koagulovaného (sraženého) koňského séra. Koagulace se provádí v šikmo položených skleněných zkumavkách v horkovzdušném sterilizátoru cca jednu hodinu při 80°C. Tato procedura se druhý den opakuje, aby byly zničeny případné kontaminující organismy klíčící ze spor přeživších první fázi sterilizace. Zkumavky s pevnou fází jsou skladovány v lednici.

Tekutá složka média se skládá z 500 ml Ringerova roztoku, jenž se připravuje smícháním dvou dílčích roztoků (viz tab. 3.) a 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku.

Tab. 3. Složení Ringerova roztoku.

| Roztok A | | Roztok B | |
|---|-----------------|--|----------------|
| NaCl | 3,25g | CaCl ₂ . 2 H ₂ O | 0,08g |
| NaHCO ₃ | 0,1g | H ₂ O | do 50ml |
| KCl | 0,07g | | |
| NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O | 0,005g | | |
| H ₂ O | do 450ml | | |

Oba dílčí roztoky (A, B) musí být připraveny a autoklávovány odděleně, aby se předešlo vysrážení fosfátů v přítomnosti vápenatých kationtů. Po zchladnutí se oba roztoky smíchají a přidá se 50ml vaječného bílku (odebírá se sterilně pipetou přibližně ze dvou vajec). Tekutá složka je pak uchovávána v lahvi v lednici. Při přípravě vlastního média jsme převrstvili pevnou složku ve zkumavkách 3ml tekuté složky (tekutou a pevnou složku jsme již měli připraveny).

3.2. Barvení prvoků

3.2.1. Barvení podle Giemsa-Romanowski

Použité chemikálie:

- Giemsa stain, modified, Sigma-Aldrich Co., USA
- Methanol
- směs čistého ethanolu s éterem (1:1)

Metodou podle Giemsa-Romanowski se u trichomonád dobře obarví jádro, cytoplasma, bičíky a axostyl. Tého metody lze s úspěchem použít při rodovém určení střevních prvoků, avšak na podrobnější morfologické studie a druhové určení není vhodné. Toto barvení pro nás bylo spíše orientační.

Na podložní sklíčka odmaštěná směsí ethanolu a éteru (1:1) jsme odpipetovali kapku z kultury (lze použít i čerstvě izolovaný střevní obsah) a provedli jsme suchý roztěr. Po zaschnutí jsme roztěr fixovali methanolem cca 5 minut. Poté jsme preparáty osušili a nechali barvit ve skupinách po 30, 40 a 50 minutách roztokem Giemsy naředěným destilovanou vodou v poměru 1:20. Pak jsme sklíčka opláchli v slabém proudu vody, osušili a pozorovali.

Takto připravené preparáty je ,v případě dlouhodobého uchovávání, nutné skladovat v temnu a suchu.

3.2.2. Barvení protargolem podle Bodiana (1917)

Použité chemikálie:

- AuCl_3 (0,25% roztok chloridu zlatitého)
- Cu (kovová měď ve formě drátků)
- doplnit acetát měďnatý
- KMnO_4 (0,5% roztok)
- Na_2SO_3 (siřičitan sodný)
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (peroxodisíran sodný)
- kys. pikrová
- kys. šťavelová (5%, 2% roztok)
- ledová kys. octová
- formaldehyd (40%)
- čistý ethanol
- xylen
- protargol (1% roztok), Bayer, Německo
- odvodňovací a zalévací řada (alkoholy 50%, 70%, 80%, 96%, 100%, karbolxylool, xylol)
- redukční roztok (roztok 1% hydrochinonu a 5% Na_2SO_3)
- směs čistého ethanolu s éterem (1:1)

Při barvení protargolem se fixuje za vlhka. Díky tomu zůstane zachována prostorová struktura buněk a je možno pozorovat vzájemné uspořádání organel. Protargolem se obarví jádro, cytoplasma, bičíky a další cytoskeletární struktury. Vzhledem k tomu, že použití této náročné metody nepřinese vždy uspokojivý výsledek, je nutné každý vzorek barvit na více sklíčkách současně (v našem případě každý vzorek na pěti sklíčkách).

Tato metoda je značně časově náročná, poměrně drahá a její výsledek je nejistý. Je nutné přesně dodržovat zavedený postup a používat kvalitních chemikálií. Nevýhodou ale je, že se metoda nedá plně kodifikovat (neexistuje ideální, přesný postup).

Příprava před fixací:

1. Ve směsi ethanolu a éteru (1:1) odmastíme krycí sklíčka, opatrně je otřeme a položíme na filtrační papír.
2. Odpipetujeme vždy část kultury do zkumavky a centrifugujeme cca 7 minut na 500G. Poté odebereme svrchní tekutinu tím způsobem, že ve zkumavkách zůstane pouze

centrifugovaná suspenze buněk, která nám bude zdrojem buněčného materiálu pro fixaci.

Postup fixace:

1. **Příprava Bouin-Hollandovy fixáže:** V destilované vodě rozpustíme 2,5 g acetátu měďnatého, ve vzniklém roztoku pak rozpustíme 4 g kyseliny pikrové. Přidáme 10 ml 40% formaldehydu a doplníme destilovanou vodou do 100 ml. Před vlastním použitím přidáme 1,5 ml ledové kyseliny octové.
2. **Fixace za vlhka:** Na odmaštěné krycí sklíčko nanese Pasteurovou pipetou malou kapku inaktivovaného koňského séra a malou kapku materiálu (v našem případě nepřidáváme koňské sérum, protože Dobell obsahuje bílek, který buňky přilepí na sklíčko stejně dobře, jako by to učinilo sérum). Obě kapky smícháme a lehce rozetřeme koncem Pasteurovy pipety. Dříve než materiál zaschne, vhodíme krycí sklíčko do Petriho misky s Bouin-Hollandovou fixáží nátěrem dolů tak, aby plavalo na hladině. Po několika minutách sklíčko obrátíme nátěrem směrem vzhůru a ponoříme jej na dno. Fixujeme 12 hodin. (1. den)
3. Abychom byli schopni rozlišit jednotlivá sklíčka, připravíme si asi 1–2 cm dlouhé tyčinky z polyethylenu, na jednom konci je žiletkou nařízneme do poloviny délky podélným řezem. Na druhém konci označíme vrypem číslo a orientaci preparátu. Do rozštěpu polyethylenové tyčinky upevníme krycí sklíčka s preparáty. Preparáty upevněné na tyčinky po fixování opláchneme v 50% ethanolu a třikrát vypereme v 70% ethanolu. V 70% ethanolu mohou být preparáty uchovány i delší dobu. Po celou dobu fixace dbáme na to, aby roztěr nezaschl.

Postup barvení:

1. Preparáty fixované Bouin-Hollandovou fixáží a konzervované 70% ethanolem převedeme přes 50% ethanol do destilované vody.
2. Preparáty vložíme do 0,5% roztoku manganistanu draselného 5 min
3. Opláchneme v destilované vodě pětkrát po 30 s.
4. Preparáty vložíme do 5% roztoku kyseliny šťavelové 5 min
5. Opláchneme v destilované vodě pětkrát po 30 s.
6. Preparáty vložíme do 1% roztoku protargolu a necháme ho působit 2 dny při 37 °C. Roztok protargolu připravujeme vždy čerstvý přímo před použitím. Navážený protargol nasypeme na hladinu destilované vody v kádince, kde jej necháme samovolně rozpustit, kádinkou netřepeme ani její obsah nemícháme. Na dno prázdné

kádinky položíme stočený měděný drát (přibližně 5 g na 100 ml protargolu), nalijeme roztok protargolu, narovnáme do ní preparáty tak, aby sklička byla ve vertikální poloze. Preparáty proložíme jemnými měděnými drátky. Kádinku dobře uzavřeme a umístíme do termostatu na 48 hodin.

7. Preparáty opláchneme v destilované vodě dvakrát po 5 s.
8. Preparáty vložíme na 10 min do redukčního roztoku. Redukční roztok (roztok 1% hydrochinonu a 5% Na₂SO₃ ve vodě) připravíme čerstvý přímo před použitím. Pokud se barví více preparátů, je nutno redukční roztok vyměňovat. Redukční roztok zredukuje stříbro v protargolu.
9. Opláchneme v destilované vodě pětkrát po 30 s.
10. Preparáty vložíme do 0,25% roztoku chloridu zlatitého 5 min
11. Opláchneme v destilované vodě dvakrát po 5 s.
12. Preparáty vložíme do 2% roztoku kyseliny oxalové 5 min
13. Opláchneme v destilované vodě pětkrát po 30 s.
14. Preparáty vložíme do 5% roztoku sirnatanu sodného 10 min
15. Vypereme proudící vodovodní vodou 15-20 min
16. Převedeme alkoholovou řadou (50%, 70%, 80%, 96%, 100%) a karbolxylolem do xylole, montujeme na podložní sklička do kapky kanadského balzámu.

Po celou dobu barvení je nutno dbát na to, aby preparáty nezaschly. Ty lze po dokončení barvení uchovávat v krabicích v horizontální poloze, aby ještě neutuhlý kanadský balzám nestékal.

3.3. Izolace DNA

Použité chemikálie:

- fyziologický roztok (0,8% NaCl)
- High pure PCR template preparation kit, Roche Diagnostic GmbH, Německo

Před izolací DNA z polyxenických kultur či střevního obsahu jsme buňky koncentrovali centrifugací 10 min při 500 G, přebytečnou tekutinu jsme pak ze zkumavek odsáli.

DNA z polyxenických kultur a střevního obsahu jsme izolovali pomocí kitu "*High pure PCR template preparation kit*" (Roche) podle protokolu 3.3.1.: "*Isolation of nucleic acids from whole blood, buffy coat, or cultured cells*". Izolovanou DNA dlouhodobě uchováváme v mrazáku při teplotě -20 °C.

Izolace DNA podle protokolu „*Isolation of nucleic acids from whole blood, buffy coat, or cultured cells*“:

- 1) Před vlastní izolací napipetujeme do plastické zkumavky 100 μ l elution buffer a necháme ohřát na 70 °C.
- 2) Pro izolaci použijeme 200 μ l střešní obsahu, který odpipetujeme do plastické zkumavky.
- 3) V rychlém sledu přidáme 200 μ l pufru s detergenty (rozpuštění membrán; green cap) a 40 μ l proteázy K.
- 4) Směs promícháme a vložíme na 10 minut do 70 °C.
- 5) Přidáme 100 μ l isopropanolu.
- 6) Přelijeme do nádobek s filtrem a centrifugujeme 1 minutu při 8000 rpm (DNA zůstane přichycena na filtru), filtrát odlijeme.
- 7) Přidáme 500 μ l pufru (blue cap) a opět centrifugujeme 1 minutu na 8000 rpm.
- 8) Odlijeme filtrát a přidáme 500 μ l pufru (blue cap) a opět centrifugujeme 1 minutu na 8000 rpm.
- 9) Centrifugujeme 10 sekund na 14000 rpm.
- 10) Nádobku s filtrem vložíme do autoklávované zkumavky.
- 11) Přidáme Elution buffer (100 μ l do každé) a centrifugujeme 1 minutu na 8000 rpm, aby se DNA vyplavila z filtru do zkumavky.

Izolovanou DNA lze zamrazit na -20 °C nebo použít rovnou pro PCR.

3.4. PCR a gelová elektroforéza

Poněvadž PCR nemusí být všem úplně známou technikou, zařadili jsme malé shrnutí principu této metody (podle Alberts a kol., 2000). PCR probíhá zcela v podmínkách *in vitro*. Pomocí této techniky může být rychle a vysoce selektivně namnožena konkrétní nukleotidová sekvence obsažená v jakékoliv DNA. PCR je založena na využití termostabilní DNA polymerázy (Taq polymeráza) pro opakované kopírování templátové molekuly DNA. Syntéza DNA je řízena krátkými oligonukleotidy (**primery**), které párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného (namnoženého) fragmentu, každý ovšem s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA. Protože primery musí být chemicky syntetizovány, PCR může být použita pouze pro amplifikaci sekvence DNA, u které známe alespoň počáteční a koncovou nukleotidovou sekvenci. Pomocí primerů nasyntetizuje DNA

polymeráza několik miliard kopií požadované sekvence, jejich konečný počet závisí na počtu cyklů.

3.4.1. Příprava roztoku pro PCR

Sterilně jsme namíchali „master mix“, rozplnili jsme ho do zkumavek po 45 μ l a přidali jsme 5 μ l izolátu DNA (viz. tab. 4.). Při přípravě „master mixu“ jsme jako koncové primery používali obecné eukaryotické primery, ale často i specifické primery pro Parabasala (lépe se totiž váží na templátovou DNA parabasalidů než obecné primery eukaryotické).

Tab. 4. PCR na 50 μ l.

| Celkové množství | 50 μ l |
|-------------------|------------|
| H ₂ O | 28,5 |
| Pufř | 5 |
| MgCl ₂ | 4 |
| DNTP | 2,5 |
| Primer 1 | 1,25 |
| Primer 2 | 1,25 |
| Taq polymeráza | 2,5 |
| Izolát DNA | 5* |

* množství můžeme měnit podle potřeby (dopočítáváme pak vodu)

Tab. 5a. Počáteční a koncové primery specifické pro SSU rDNA skupiny Parabasala.

| Název | Orientace | Sekvence 5' - 3' |
|-------|-------------|-------------------------|
| 16Sl | F (Forward) | TAC TTG GTT GAT CCT GCC |
| 16Srr | R (Reverse) | GTT CCA TTG CCA TCC ACT |

Tab. 5b. Obecné eukaryotické počáteční a koncové primery.

| Název | Orientace | Sekvence 5' - 3' |
|---------|-------------|---------------------------------|
| MedlinA | F (Forward) | CGT GTT GAT CTT GCC AG |
| MedlinB | R (Reverse) | TGA TCC TTC TGC AGG TCC ACC TAC |

3.4.2. Vlastní PCR

Vlastní PCR probíhá v termocykléru. Skládá se z několika opakujících se kroků, které jsme popsali v následující tabulce (viz tab. 6.).

Tab. 6. Průběh vlastní PCR.

| Počet cyklů | Teplota | Čas | Proces |
|-------------|---------|--------|----------------------|
| 1 | 94 °C | 1 min | počáteční denaturace |
| 35 | 94 °C | 1 min | denaturace |
| | 38 °C | 1 min | nasednutí primeru |
| | 72 °C | 2 min | polymerace |
| 1 | 72 °C | 10 min | závěrečná polymerace |

3.4.3. Gelová elektroforéza

Použité chemikálie:

- TAE pufr
- agaróza
- ethidiumbromid (zásobní roztok 10 mg.ml⁻¹), BDH chemicals, Ltd., GB
- nanášecí pufr, 6x konc. (0,25% bromfenolová modř, 0,25% xylencyanol, 30% glycerol)
- mikrovlnná trouba

Gelovou elektroforézu jsme prováděli jako kontrolu izolace DNA a po ukončení PCR reakce, abychom zjistili, jestli se izolovaná DNA amplifikovala. Pro zviditelnění DNA jsme používali ethidiumbromid, který se zabudovává do širšího žlábků na molekule DNA a je viditelný pod UV světlem. Vizualizovaný gel jsme pak vyfotografovali videokamerou.

Příprava gelu

- 1) Navážíme 0,4 g agarózy
- 2) Přilijeme 40 ml TAE pufru
- 3) Přivedeme k varu, lehce ochladíme, přikápneme 2 kapky (v našem případě 14 µg) ethidiumbromidu
- 4) Nalijeme do vaničky, zasuneme hřeben a necháme utuhnout (cca 30 minut)

Loadování DNA

- 1) Na parafilmu smísíme loadovací pufr s PCR produktem v poměru 1:5.
- 2) Takto připravené roztoky napipetujeme do jamek v gelu, nezapomeneme přidat negativní a pozitivní kontrolu.
- 3) Připojíme ke zdroji elektrického napětí ($8 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.4.4. Vyhodnocení výsledků elektroforézy

- 1) Podle standardu určíme přibližné délky jednotlivých řetězců DNA a vybereme proužky s délkou přibližně 1500- 2500 bází, které mohou být hledanou SSU rDNA.
- 2a) Pokud je ve vzorku vyhovující proužek pouze jediný (v našem případě tomu tak bylo vždy), můžeme rovnou přistoupit k sekvenaci (použijeme k tomu zbylý PCR produkt).
- 2b) Pokud je ve vzorku více takových proužků, musíme je z gelu vyříznout, zaligovat do plasmidu a namnožit v bakteriích.

3.5. Určování sekvencí

PCR produkt musíme nejprve přečistit od primerů kitem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) podle protokolu "*QIAquick PCR Purification Protocol using a microcentrifuge*". Následně provedeme vymytí DNA do 25 μl elučního pufru.

3.5.1. Sekvenační reakce a vlastní sekvenace

Použité chemikálie:

- ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit, Applied Biosystems, USA
- sterilní miliQ H_2O
- ethanol (70%, 96%)
- octan sodný (NaAc, 3M)

S přečištěným vzorkem jsme provedli sekvenační PCR. K jeho provedení jsme použili kit "*ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit*" (Applied Biosystems). Oproti původnímu protokolu jsme z finančních důvodů použili čtvrtinovou koncentraci *Terminator Ready reaction Mix*. I tato tzv. čtvrtinová sekvenační reakce poskytuje totiž uspokojivé výsledky. Pro každý primer jsme připravili reakční směs zvlášť. Sekvenační reakce jsme nechali probíhat v termocykleru PT C-200 (MJ Research).

Tab. 7. Složení reakční směsi pro čtvrtinovou sekvenační reakci primerů 514F, 1055R, 1385R.

| Chemikálie | Množství |
|-------------------------------|-----------------------|
| Terminator Ready reaction mix | 2 μ l |
| Sekvenační pufr (terminator) | 4 μ l |
| Primer | 3,2pmol |
| DNA | 2 μ l |
| H ₂ O | doplnit do 20 μ l |

Tab. 8. Složení reakční směsi pro čtvrtinovou sekvenační reakci primerů 16SF, 16SRR.

| Chemikálie | Množství |
|-------------------------------|-----------------------|
| Terminator Ready reaction mix | 2 μ l |
| Sekvenační pufr (terminator) | 4 μ l |
| Primer | 0,32pmol |
| DNA | 2 μ l |
| H ₂ O | doplnit do 20 μ l |

Tab. 9. Primery používané pro kompletní sekvenaci SSU rDNA trichomonád (*Hypotrichomonas*).

| Název | Orientace | Sekvence 5' → 3' |
|-------|-----------|-------------------------|
| 514F | F | GTG CCA GCM GCC GCG G |
| 1055F | R | GGT GGT GCA TGG CCG |
| 1055R | R | CGG CCA TGC ACC ACC |
| 1385R | R | GAT CCT AAC ATT GTA GC |
| 16Sl | F | TAC TTG GTT GAT CCT GCC |
| 16Srr | R | GTT CCA TTG CCA TCC ACT |

Tab. 10. Nastavení teplotního cyklu v termocykleru pro sekvenační reakci.

| Počet | Teplota | Čas |
|-------|---------|-------|
| 25 | 96 °C | 10 s |
| | 50 °C | 5 s |
| | 60 °C | 4 min |

Následná příprava reakce pro analýzu na automatickém sekvenátoru zahrnuje přečištění (vysrážení) DNA ethanolem s octanem sodným :

1. K sekvenační reakci (20 μ l) přidáme 50 μ l 96% ethanolu a 2 μ l 3M acetátu sodného.
2. Necháme mikrozkuřavku s reakcí stát v pokojové teplotě 15 minut, aby se vysrážela (precipitovala) DNA.
3. Centrifugujeme 15 minut při 12000rpm.

4. Opatrně odebereme supernatant.
5. Přidáme 250µl 70% ethanolu.
6. Centrifugujeme 5 minut při 12000rpm.
7. Opatrně odebereme supernatant.
8. Usušíme pelet (obvykle nepozorovatelný).
9. Resuspendujeme pelet ve 25µl *Template Suppression reagent*, vzorky protřepeme a centrifugujeme.
10. Zahřejeme na dvě minuty na 95°C, poté zchladíme na ledu. Vzorky protřepeme a centrifugujeme.

Takto připravené vzorky jsme následně poslali na analýzu sekvenátorem 3100-Avant Genetic Analyser, Applied Biosystems, USA.

3.6. Vyhodnocování sekvencí

Použité programy:

- Seqman (v. 3.61), DNASTAR Inc., USA
- BioEdit (v. 5.0.9.), Hall, 1999

Výstupy sekvenací mají formu křivek fluorescence a prohlížíme je v programu BioEdit verze 5.0.9. (Hall, 1999). Občas se stává, že se v grafu objeví více křivek fluorescence (je zde více signálů). To může být způsobeno například přítomností více taxonů nebo tím, že primer nasedl na několik různých oblastí DNA.

V programu SeqMan II verze 3.61 vzniklé křivky ořízneme (každý primer poskytuje spolehlivá data jen z části sekvence, nekvalitní zbytek musíme odstranit) a pečlivě zkontrolujeme, neboť se stává, že nejasná místa program špatně vyhodnotí. Spojíme jednotlivé dílčí sekvence do tzv. „contigu“. Výslednou sekvenci uložíme ve formátu FASTA.

3.7. Tvorba a úprava alingmentu

Použité programy:

- ClustalX (verze 1.81), Thompson *et al.*, 1997
- BioEdit (v. 5.0.9.), Hall, 1999

Z námi získané sekvence SSU rDNA BSP1, ze sekvencí PRA, CYCL2, LEP1, CORAL1, KANEK a KAS5 poskytnutých I. Čepičkou, a ze 62 sekvencí získaných z databáze GenBank

(www.ncbi.nlm.nih.gov) jsme sestrojili dataset (soubor sekvencí pro fylogenetickou analýzu). Dataset jsme ve formátu FASTA vložili do programu ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) a pomocí něj jsme provedli alignment. Při tvorbě alignmentu jsme zachovali původní přednastavené parametry programu (např. Gap Opening Penalty 15, Gap Extension Penalty 6,66).

Alignment je určité „seřazení“ („homologizace“) jednotlivých pozic sekvencí (viz obr. 11.).

Vzhledem k tomu, že jednotlivé sekvence se mohou lišit nejen záměnami bází (substitucemi), ale také delecemi/insercemi (indel), vytváří program místo chybějících úseků prázdná místa („gapy“; znázorněné pomlčkami).

Alignment jsme převedli do programu BioEdit (Hall, 1999), kde jsme dále ručně upravili oblasti, které byly zjevně špatně alignovány. Také jsme z alignmentu odstranili hypervariabilní oblasti, u kterých jsme si nebyli jisti, zda jsou (a zda vůbec mohou být) správně alignovány. Začátek a konec alignmentu jsme zkrátili tak, aby všechny sekvence začínaly a končily ve stejné pozici. Oblasti, kde chyběla data (např. začátky a konce některých sekvencí) jsme doplnili znaky *N*. Alignment jsme převedli do formátů Nexus (přípona *.nex) a Phylip 4 (přípona *.phy).

| | | |
|----|----------------|--------------------------|
| 1 | LEP1 | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 2 | CORAL1 | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 3 | Hacosta | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 4 | BUB | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 5 | KAS5 | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 6 | KANEK | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 7 | agilis | TGATGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 8 | magnagp31 | TGATGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 9 | hoplonympha2 | TCTGGCTCGTGCATGCCCGTTGG' |
| 10 | eucomonymphaMO | TTTGGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 11 | teranymphal | TTTGGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 12 | pseudotrichony | TTTGGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 13 | staurojoeninaA | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 14 | SnymphaHs1 | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 15 | Snymphella | TGTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 16 | Holomastigotoi | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |
| 17 | Leidyi | TTTTGGTGGTGCATGGCCGTTGG' |

Obr. 11. Ukázka části alignmentu naší analýzy.

3.8. Fylogenetická analýza

Použité programy:

- PAUP (v. 4.0b10), Swofford, 2002
- PHYML (v. 2.4.4.), Guindon a Gascuel, 2003
- Modeltest (v. 3.06), Posada and Crandall, 1998
- MrBayes (v. 3.1.1.), Huelsenbeck, 2000
- Corel Draw

Fylogenetickou analýzu používáme, abychom vytvořili model evoluce zkoumaných taxonů na základě rozdílů v sekvencích nukleotidů vybraných genů. V naší práci vycházíme z fylogenetické analýzy sekvencí genu SSU rDNA. Výstupem naší fylogenetické analýzy je konsenzuální fylogenetický strom získaný porovnáním stromů konstruovaných pomocí metody maximální parsimonie (MP), metody maximální věrohodnosti (ML), Bayesovy metody (Bayes) a metody nejmenších čtverců (LS).

Fylogenetické metody, které jsme použili, sestavují jednotlivé stromy podle určitého specifického algoritmu a hodnotí je podle určitého specifického kritéria optimality. Nejoptimálnější topologie je považována za správnou.

Dataset, který jsme použili k analýze, obsahoval příliš mnoho sekvencí, tudíž nebylo z časových důvodů možné pomocí fylogenetických metod prohledat všechny existující topologie. Abychom tento problém obešli, použili jsme heuristické hledání s náhodným přidáváním jednotlivých sekvencí a swapování metodou TBR (tree-bisection-and-reconnection), díky čemuž jsme dosáhli lokálního maxima počáteční topologie. Vzhledem k tomu, že lokální maximum se nemusí shodovat s maximem globálním, vytvořili jsme deset replikátů. Vycházeli jsme přitom z předpokladu, že nejlepší z těchto replikátů dosahuje nejen maxima lokálního, ale i globálního.

3.8.1. Metoda maximální parsimonie (Maximal parsimony; MP)

Metoda maximální parsimonie porovnává vzniklé topologie jednotlivých stromů a hledá takovou topologii, jejíž sestavení je nejjednodušší, tj. takovou topologii, která předpokládá nejmenší počet nukleotidových změn. Vlastní porovnávání se děje na základě porovnávání skóre stromů, které se vypočítá sečtením skóre jednotlivých pozic. Všechny záměny nukleotidů jsou přitom stejně pravděpodobné. Fylogenetickou analýzu pomocí této metody jsme prováděli v programu PAUP (v. 4.0b10), vytvořili jsme 300 bootstrapových subreplikátů.

Seznam zadávaných příkazů:

set autoclose=yes increase=auto;

(Po skončení analýzy se program automaticky zavře)

set criterion=parsimony;

(Pomocí tohoto příkazu jsme vybrali metodu maximální parsimonie)

hsearch start=stepwise addseq=random nreps=10 swap=tbr;

(Heuristické hledání bude postupné; sekvence budou přidávány náhodně; bude vytvořeno 10 replikátů; strom bude swapován metodou TBR až do lokálního maxima. Je velmi pravděpodobné, že bude nalezeno maximum globální)

savetree file=MP.tre brlens=yes;

(Výsledný strom bude uložen jako MP.tre; budou zde uvedeny délky větví)

bootstrap nreps=300 keepall=yes search=heuristic / start=stepwise addseq=random nreps=10 swap=tbr;

(Bude vytvořeno 300 bootstrapových subreplikátů; uzly, které budou vytvořeny v méně jak 50 subreplikátech, budou zachovány; hledání jednotlivých dílčích topologií bude probíhat heuristicky)

savetree file=MPboot.tre savebootp=nodelabels maxdecimals=0 from=1 to=1000000;

(Výsledný strom bude uložen jako MPboot.tre, přičemž v uzlech bude zaznamenáno procento bootstrapových subreplikátů, v nichž byl uzel vytvořen stejnými sekvencemi. Bootstrapy nahradí původní přednastavení, které vyjadřuje bootstrapy délkami větví)

end;

3.8.2. Metoda maximální věrohodnosti (Maximum likelihood; ML)

Hledá takovou topologii, která je pro daná data nejpravděpodobnější. Nejpravděpodobnější je ten strom, jehož záměny jsou z hlediska výskytu bazí nejvěrohodnější. Metoda spočte na základě našich dat pravděpodobnost jednotlivých záměn a na základě toho určuje věrohodnost jednotlivých dílčích topologií.

Pro tvorbu stromu nám byl pomocí likelihood ratio testu provedého v programu Modeltest doporučen model TrN + I + Γ - evoluční model Tamura a Nei s invariantami a gamma korekcí). Tento model vychází z různých pravděpodobností jednotlivých záměn, které jsou reverzibilní, tj. $P(A \rightarrow C) = P(C \rightarrow A)$. Kromě toho počítá tento model i s gamma korekcí (pracuje s různými mutačními rychlostmi) a invariantami (pozice, které nemohou z funkčního hlediska mutovat). Analýzu pomocí metody maximální věrohodnosti jsme dělali

v programu PAUP (v. 4.0b10), bootstrapovou analýzu jsme z časových důvodů provedli v programu PHYML (v. 2.4.4.), kde jsme vytvořili 100 bootstrapových subreplikátů.

Seznam zadávaných příkazů v programu PAUP:

set criterion=likelihood;

(Pomocí tohoto příkazu jsme vybrali metodu maximální věrohodnosti)

lset base=(0.3228 0.1687 0.2531) nst=6 rmat=(1.0000 2.1047 1.0000 1.0000 3.9796)

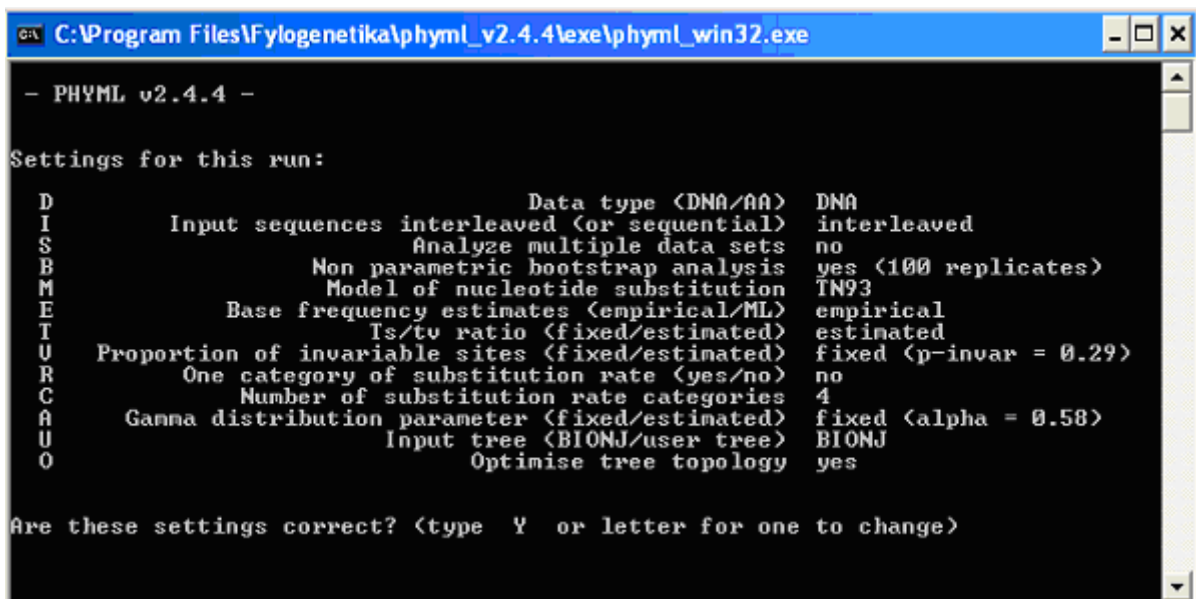
rates=gamma shape=0.5756 pinvar=0.2954;

(Pomocí příkazu lset zadáváme evoluční model, který nám byl vybrán pomocí likelihood ratio testu)

hsearch;

savetree file=ML.tre brlens=yes;

end;



```
C:\Program Files\Fylogenetika\phymml_v2.4.4\exe\phymml_win32.exe
- PHYML v2.4.4 -
Settings for this run:
D          Data type <DNA/AA>          DNA
I      Input sequences interleaved (or sequential)  interleaved
S          Analyze multiple data sets      no
B          Non parametric bootstrap analysis  yes <100 replicates>
M          Model of nucleotide substitution  TN93
E          Base frequency estimates <empirical/ML>  empirical
I          Is/tv ratio <fixed/estimated>          estimated
U      Proportion of invariable sites <fixed/estimated>  fixed <p-invar = 0.29>
R          One category of substitution rate <yes/no>      no
C          Number of substitution rate categories          4
A          Gamma distribution parameter <fixed/estimated>  fixed <alpha = 0.58>
U          Input tree <BIONJ/user tree>          BIONJ
O          Optimise tree topology              yes

Are these settings correct? <type Y or letter for one to change>
```

Obr. 12a. Ukázka nastavení programu PHYML (v. 2.4.4.) pro bootstrapovou analýzu metody ML.

3.8.3. Metoda nejmenších čtverců Fitch-Margoliash (Least squares method; LS)

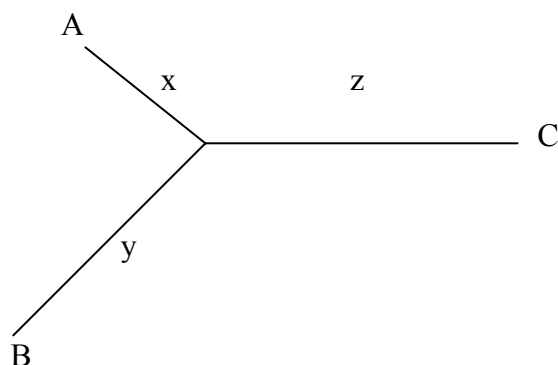
Program nám spočítá pozorované distance, tedy rozdílnost dvou sekvencí při zvoleném evolučním modelu (na obr. 12b.) by pozorované distance určovali vzdálenost A→B, B→C, C→A). Následně program řeší soustavu rovnic, aby dostal velikosti x, y, z (patristické distance; vzdálenost dané sekvence od hypotetického předka). Díky tomu, že výsledná

topologie stromu není přesně shodná s průběhem evoluce, není ani součet $x + y$ přesně roven vzdálenosti $A \rightarrow B$, tj. velikosti pozorované distance. Nejlepší strom určí program porovnáním druhých mocnin rozdílů patristických a pozorovaných distancí. Čím menší tento čtverec rozdílů je, tím optimálnější je daná topologie.

Metodu nejmenších čtverců jsme prováděli v programu PAUP (v. 4.0b10), počet bootstrapových subreplikátů byl 100, zvolený evoluční model byl shodný s modelem pro ML, tedy TrN + I + Γ evoluční model Tamura a Nei s invariantami a gamma korekcí).

Seznam zadávaných příkazů:

```
set criterion=distance;
dset distance=ml objective=lsfit;
lset base=(0.3228 0.1687 0.2531) nst=6 rmat=(1.0000 2.1047 1.0000 1.0000 3.9796)
rates=gamma shape=0.5756 pinvar=0.2954;
hsearch;
savetree file=LS.tre brlens=yes;
bootstrap nreps=100;
savetree file=LSboot.tre savebootp=nodelabels maxdecimals=0 from=1 to=1000000;
end;
```



Obr. 12b. Ilustrační obrázek k vypočítávání optimality stromů sestavených metodou LS.

3.8.4. Bayesova metoda (Bayesian posterior probability; Bayes)

Provádí se v programu MrBayes (v. 3.1.1.).

Seznam zadávaných příkazů:

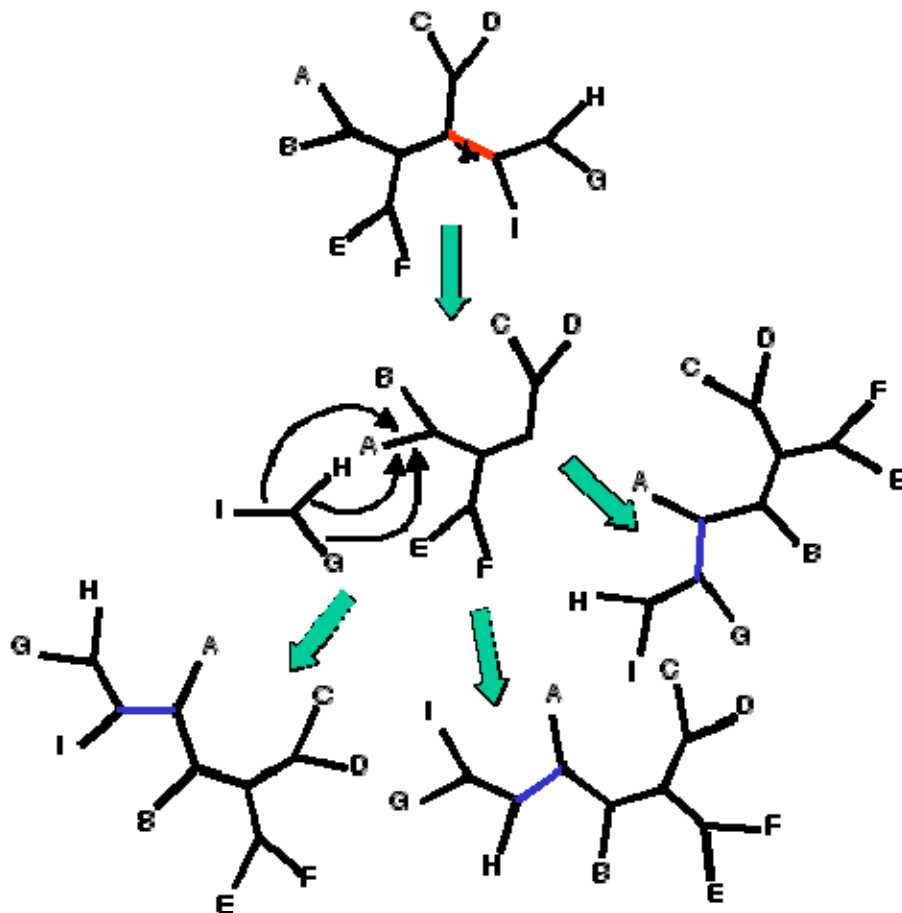
```
execute aaa.nex
lset nst=6 rates=invgamma covarion=yes
mcmc ngen=1500000 savebrlens=yes
```

sumt burnin=4000 contype=allcompat

3.8.5. Vytvoření konsenzuálního stromu

Výsledkem každé z výše popsaných čtyř fylogenetických analýz je jeden bootstrapovaný strom. Pomocí programu Corel Draw tedy musíme na závěr celé analýzy vytvořit ručně strom konsenzuální, který zahrnuje výsledky všech fylogenetických analýz, které jsme provedli.

Jako základní strom jsme použili fylogram sestavený metodou ML pod modelem TrN + I + Γ V uzlech uvádíme bootstrapy v pořadí bootMP/bootLS/bootML/Bayes. Kromě Bayesovy metody jsou bootstrapy uvedeny v procentech, Bayes se uvádí jako pravděpodobnost (0-1). Pokud je někde místo čísla uvedena hvězdička, znamená to nízkou podporu dané topologie.



Obr. 12c. Tree-bisection-and-reconnection technika. Červená větev – místo řezu. Modrá větev – nově vytvořená větev. Zde je ukázka pouze jednoho řezu a nová větev je umisťována pouze na větev taxonu A. V tomto případě možno udělat ještě pět dalších řezů původního stromu, nová větev může spojovat jakékoli vnější nebo vnitřní větve. Obrázek stažen z internetové adresy <http://artedi.ebc.uu.se/course/BioInfo-10p-2001/Phylogeny/Phylogeny-TreeSearch/TBR.gif>.

VÝSLEDKY

4.1. Získané izoláty prvoků

Analyzovali jsme obsah střeva patnácti jedinců švábů zastoupených v deseti druzích a sedmi rodech (viz tab. 11). Všechny analyzované rody patří do jediné nadčeledi (Blaberoidea). S výjimkou rodu *Ergaula* (Polyphagidae) patří i do jediné čeledi (Blaberidae). Většina analyzovaných zástupců čeledi Blaberidae, s výjimkou rodů *Panchlora*, *Gromphadorhina* a *Rhyparobia*, se řadí do podčeledi Blaberinae. *Panchlora* zastupuje podčeď Panchlorinae; *Gromphadorhina* a *Rhyparobia* patří naproti tomu do podčeledi Oxyhaloinae.

Veškeré šváby jsme získali z dlouholetých chovů, většinu z nich ze zoologické zahrady v Plzni, některé z chovů ing. Bužgy. Druh *Gromphadorhina portentosa* jsme získali ze Zoologické zahrady Praha (viz tab. 11). Většina analyzovaných švábů je původem z Ameriky, *Gromphadorhina portentosa* je z Madagaskaru a u *Rhyparobia maderae* si jejím původem nejsme jisti (přírodně se vyskytuje v Americe, Africe, jižní Asii a Oceánii).

Z každého pitvaného jedince jsme odebrali vzorek obsahu střeva na kultivaci v médiu Dobell-Leidlaw. Zároveň jsme z obsahu střeva připravili nativní preparát a provedli zběžnou prohlídku mikroflóry (viz tab. 12) pomocí pozorování ve fázovém kontrastu. Prvoci se mnohdy nedají z nativního preparátu spolehlivě určit ani do rodu a už vůbec ne na úroveň druhu (alespoň pokud jde o parabasalidy). Jistotu rodového a druhového určení máme tedy u zástupců kmene Parabasala až za použití barvení či molekulárně-taxonomických metod.

Z analyzovaných vzorků jsme získali sedm izolátů ze šesti různých druhů švábů (viz tab. 12). Podařilo se nám v nich stabilně kultivovat nejméně čtyři druhy prvoků. Přitom ve dvou izolátech je přítomen pouze jeden druh prvoka, což nám značně usnadňuje další práci.

Tab. 11. Zkoumaní švábi a prvoci pozorovaní v jejich střevech.

| Čeled' | Druh | Zdroj | Nativní preparát |
|--------------|----------------------------------|---------------|---|
| Blaberidae | <i>Archimandrita tessellata</i> | ZOO Plzeň | <i>Retortamonas blattae</i> , <i>Monocercomonoides</i> sp. (Oxymonada), Trichomonadida gen. sp. (Parabasala), <i>Nyctotherus ovalis</i> (Ciliophora), améby |
| | <i>Blaberus atropos</i> | ZOO Plzeň | <i>Nyctotherus ovalis</i> , 2 typy kinetoplastid (Trypanosomatina), <i>Monocercomonoides</i> sp., Trichomonadida gen. sp. |
| | <i>Blaberus craniifer</i> | ZOO Plzeň | <i>Nyctotherus ovalis</i> , Trichomonadida gen. sp. |
| | <i>Blaberus giganteus</i> | ZOO Plzeň | kvasinky (ve velkém množství) |
| | <i>Blaberus</i> sp. | ZOO Plzeň | Trichomonadida gen sp., gregariny (Apicomplexa) |
| | <i>Byrsotria fumigata</i> | Ing. Bužga | <i>Retortamonas blattae</i> , <i>Monocercomonoides</i> sp., Trichomonadida gen. sp. |
| | <i>Gromphadorhina portentosa</i> | ZOO Praha | ----- |
| | <i>Panchlora nivea</i> | ZOO Plzeň | ----- |
| | <i>Rhyparobia maderae</i> | Ing. Bužga | gregariny, <i>Monocercomonoides</i> |
| Polyphagidae | <i>Ergaula capucina</i> | ZOO Plzeň | améby, <i>Nyctotherus ovalis</i> |

Tab. 12. Přehled stabilních kultur, jež jsme získali.

| Název izolátu | Druh | Organismy |
|---------------|---------------------------------|---|
| ARCH1 | <i>Archimandrita tessellata</i> | <i>Hypotrichomonas</i> sp., ¹ <i>Monocercomonoides</i> sp. |
| BAT1 | <i>Blaberus atropos</i> | <i>Hypotrichomonas</i> sp., <i>Monocercomonoides</i> sp. |
| BCR1 | <i>Blaberus craniifer</i> | <i>Hypotrichomonas</i> sp. ¹ |
| BSP1 | <i>Blaberus</i> sp. | <i>Hypotrichomonas</i> sp. ¹ |
| BFUM1 | <i>Byrsotria fumigata</i> | <i>Monocercomonoides</i> sp., améby |
| RMAD1 | <i>Rhyparobia maderae</i> imago | améby |
| RMAD2 | <i>Rhyparobia maderae</i> nymfa | <i>Monocercomonoides</i> sp., améby |

¹ Získali jsme sekvenci SSU rDNA (viz dále)

4.2. Morfologie

Obarvili jsme šest našich izolátů protargolem (ARCH1, BCR1, BSP1, BAT1, BFUM1, RMAD2). Ivan Čepička nám poskytl své protargolem obarvené izoláty CYCL2 z leguána *Cyclura nubila* a PRA z prasete domácího (odebráno v ČR). Od prof. Kuldy nám byl zapůjčen protargolem obarvený preparát *Hypotrichomonas acosta* z hroznýše *Boa constrictor*. Obarvené preparáty jsme pozorovali pod světelným mikroskopem a vyfotili typické jedince (viz obr. 13-17).

Světelný mikroskop poskytuje obraz, který je zaostřen na určitou rovinu. Ostatní roviny se do ní promítají, ruší její čistotu a dávají poněkud falešný pocit trojrozměrnosti. Mnohé struktury, které jsou ve vzdálenějších rovinách, jsou proto na fotografiích téměř nerozpoznatelné (jsou překryty jinými bližšími rovinami), ale nechybí (týká se zdánlivé absence undulující membrány na některých fotografiích apod.)

Preparát *Hypotrichomonas acosta* zapůjčený prof. Kuldou odpovídá popisu *H. acosta* (Lee, 1960). Je asi dvakrát větší než švábí hypotrichomonády a obsahuje i gigantické buňky (obr. 13c). Buňka má tři přední bičíky a jeden zpětný, který tvoří undulující membránu. Axostyl je silný a jeho kapitulum široké, pelta je dobře vyvinuta (viz obr. 13a, b). Undulující membrána je různého stupně vyvinutí, obvykle ale nedosahuje konce buňky.

Zástupci rodu *Hypotrichomonas* z izolátů BSP1, BCR1, ARCH1 a BAT1 jsou geneticky a pravděpodobně i morfologicky identičtí, zcela jednoznačně se jedná o nový druh, jehož částečný popis zde uvádíme. Axostyl je tenký, u jádra se ale mírně rozšiřuje (viz obr. 14c), kapitulum je úzké. Pelta je dobře vyvinuta, stejně jako u *H. acosta* ale není zřetelně vyvinuta kosta. Buňka má tři přední bičíky a jeden zpětný, který se podílí na vzniku undulující membrány. Ta je velmi dobře vyvinuta, obvykle dosahuje za polovinu buňky, někdy je silně spirální (viz obr. 15).

Izolát PRA představuje morfologicky i fylogeneticky další nový druh rodu *Hypotrichomonas*. Tenkým axostylem a úzkým kapitulem axostylu připomíná předchozí druh, ale undulující membrána je extrémně krátká a nedosahuje zpravidla ani do čtvrtiny délky buňky (viz obr. 16a, b).

Hypotrichomonas z izolátu CYCL2 je dalším novým druhem tohoto rodu. Kmen axostylu je tenčí než u *H. acosta* (podobně jako u dvou předchozích, viz obr. 17a, c), ale jeho kapitulum se výrazně rozšiřuje, podobně jako u *H. acosta* (viz obr. 13a, c). Undulující membrána je silně vyvinuta a zpravidla dosahuje do konce buňky (viz obr. 17a, b). Může být spirální. Pelta je u tohoto druhu dobře vyvinuta.

Tab. 13. Tabulka morfologických rozdílů druhů *H. acosta*, *H. sp. BSP1*, *PRA* a *CYCL2*. Ax – axostyl;
UM – undulující membrána.

| DRUH | UM | Kmen Ax | Kapitulum Ax |
|-------------------------|----------------------------------|---------|-----------------|
| <i>H. acosta</i> | nedosahuje konce buňky | silný | široké |
| <i>H. sp. (BSP1...)</i> | dosahuje za polovinu buňky | úzký | mírně rozšířené |
| <i>H. sp. (PRA)</i> | nedosahuje ani do čtvrtiny buňky | úzký | úzké |
| <i>H. sp. (CYCL2)</i> | dosahuje do konce buňky | úzký | široké |

Prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*) je jediným teplokrevným hostitelem rodu *Hypotrichomonas*. Zajímalo nás tedy, jestli švábí izoláty přežijí teplotu 37 °C (při této teplotě se kultivují prvoci z teplokrevných živočichů, kultivujeme tak samozřejmě i prasečí izolát PRA). Vložili jsme proto izoláty BCR1 a BSP1 do termostatu a již druhý den jsme zjistili, že hypotrichomonády teplotu 37 °C nepřežily. Následně jsme izolát PRA vložili do 24 °C a již druhý den jsme v kontrolním preparátu nepozorovali žádné živé hypotrichomonády. Po pěti dnech jsme kulturu přeočkovali (s negativním výsledkem), čímž jsme vymření kultury potvrdili.

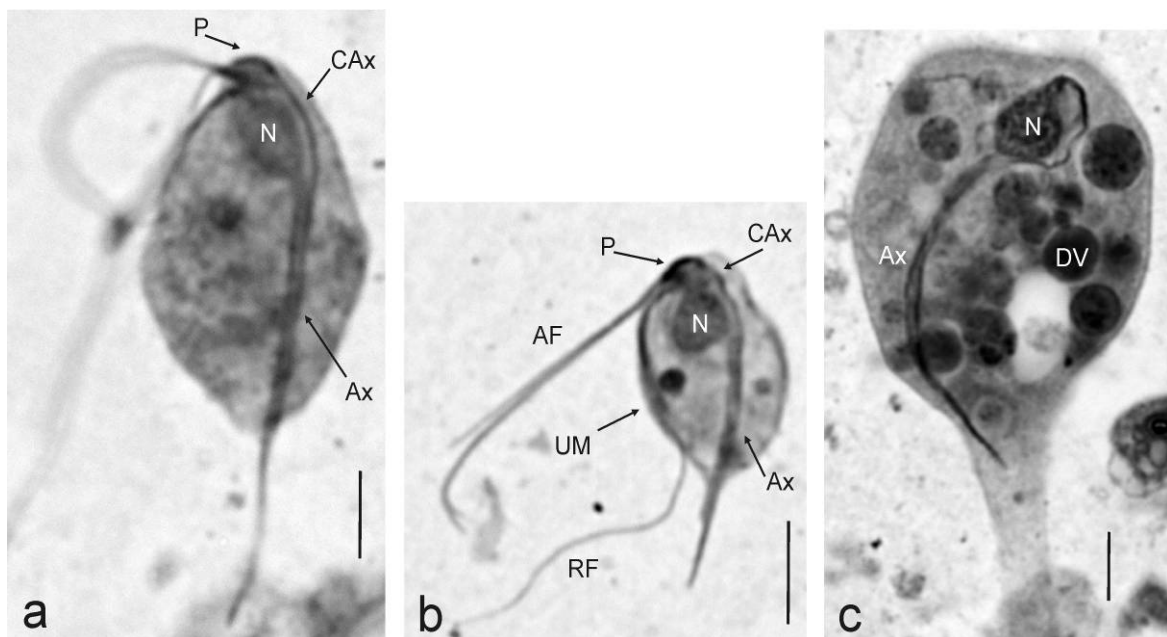
Dále jsme provedli základní morfometrická měření (šířka a délka buňky) izolátů ARCH1, BSP1 a Kuldova preparátu *H. acosta*. Z každého izolátu jsme změřili 50 jedinců.

Tab. 14. Rozměry buněk rodu *Hypotrichomonas* (*H. acosta* a izoláty ze švábů – ARCH1, BSP).

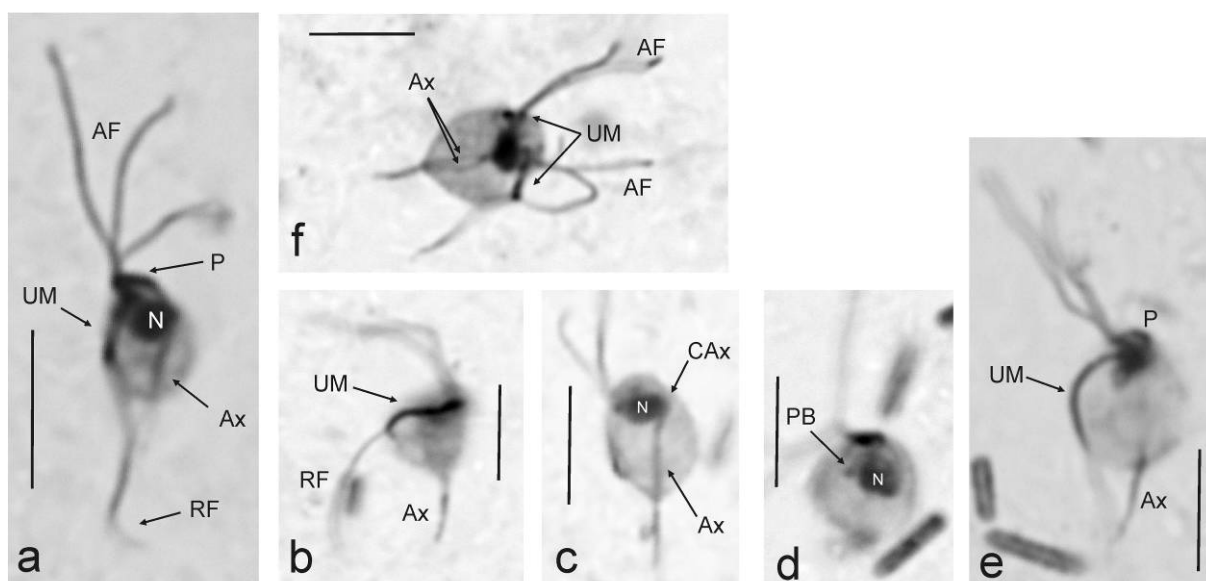
| | Délka buňky | | | Šířka buňky | | |
|--------|--------------------|---------------------|------------|--------------------|---------------------|------------|
| | Aritmetický průměr | Směrodatná odchylka | Rozpětí | Aritmetický průměr | Směrodatná odchylka | Rozpětí |
| ACOSTA | 12,1 | 1,87 | 7,99-15,28 | 9,3 | 1,86 | 4,69-13,81 |
| ARCH1 | 5,6 | 0,79 | 4,05-7,25 | 4,1 | 0,62 | 2,72-5,9 |
| BSP1 | 5,2 | 0,64 | 3,95-6,92 | 3,9 | 0,46 | 2,91-5,08 |

Kromě rodu *Hypotrichomonas* jsme v izolátech ARCH1, BAT1, BFUM1 a RMAD2 determinovali ještě zástupce rodu *Monocercomonoides* (viz obr. 18.). Zatím jsme je blíže nezkoumali ani nesekvenovali. Máme však jistotu, že jde o rod *Monocercomonoides*.

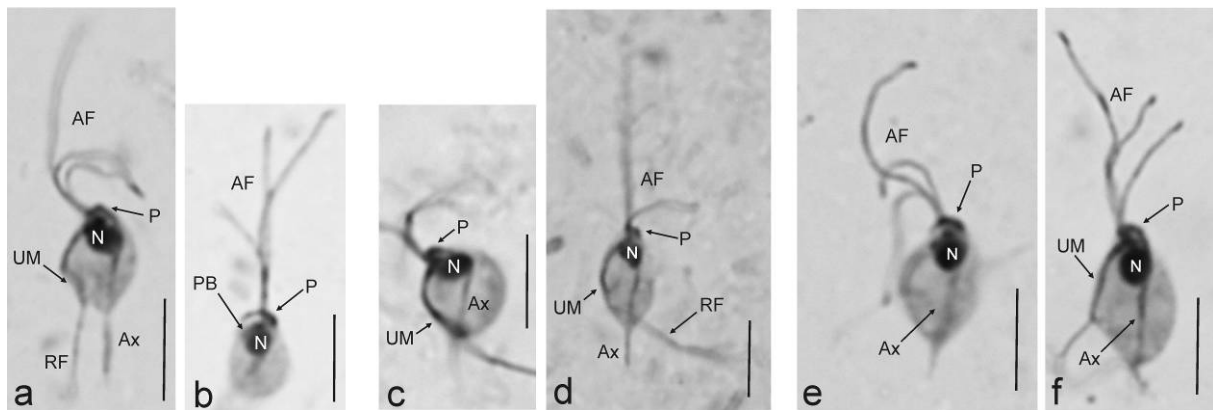
V izolátu RMAD2 jsme zaznamenali početnou populaci améb. Protože protargolové barvení není vhodná metoda pro determinaci měňavek, nevíme, o který rod se jedná. Nejvíce se tyto měňavky podobají rodu *Endamoeba* (obr. 19d). Podobně jsou i v izolátu BFUM1 přítomny měňavky (obr. 20), v tomto případě ale připomínají rod *Endolimax* (obr. 20d).



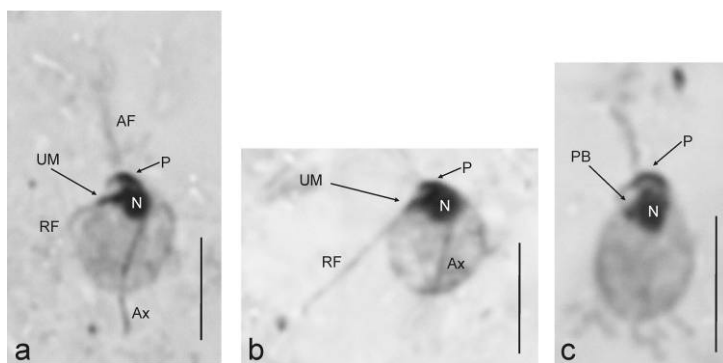
Obr. 13. *Hypotrichomonas acosta* z *Boa constrictor* (a – c). AF – přední bičíky; Ax – axostyl; Cax – kapitulum axostylu; DV – trávicí vakuola; N - jádro; P – pelta; RF – zpětný bičík; UM – undulující membrána. Preparát zapůjčen prof. J. Kuldou. Měřítko – 5 μ m.



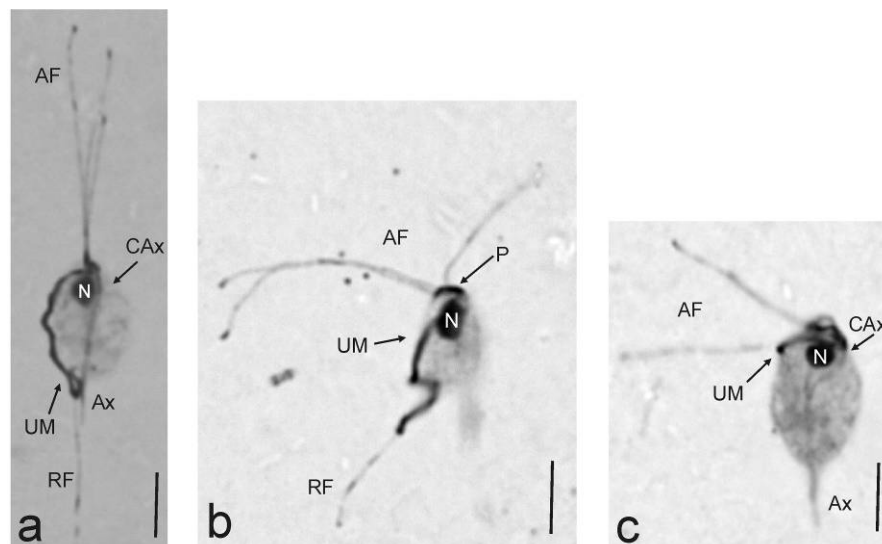
Obr. 14. *Hypotrichomonas* sp. BSP1. a – e normální buňky; f – počátek buněčného dělení. AF – přední bičíky; Ax – axostyl; Cax – kapitulum axostylu; N - jádro; P – pelta; PB – rameno parabasálního tělíska; RF – zpětný bičík; UM – undulující membrána. Měřítko – 5 μ m.



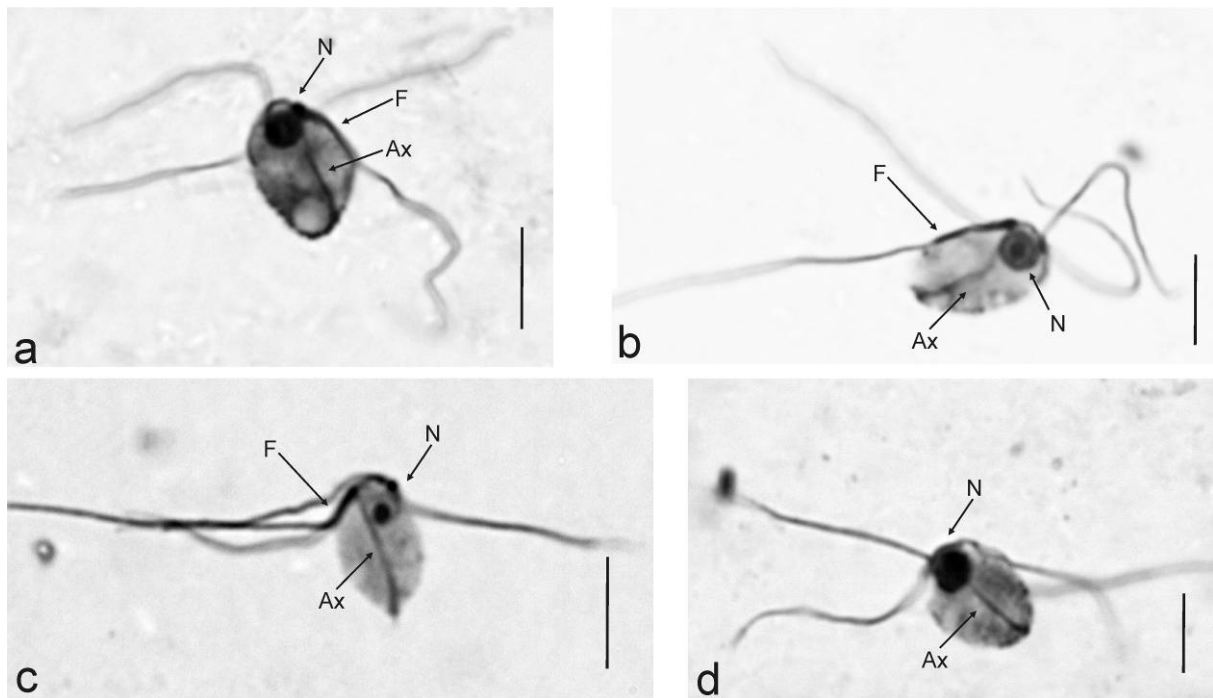
Obr. 15. *Hypotrichomonas* sp. BCR1 (a, b), ARCH1 (c, d), BAT1 (e, f). AF – přední bičíky; Ax – axostyl; N - jádro; P – pelta; PB – rameno parabasálního tělíska; RF – zpětný bičík; UM – undulující membrána. Měřítka – 5 μm .



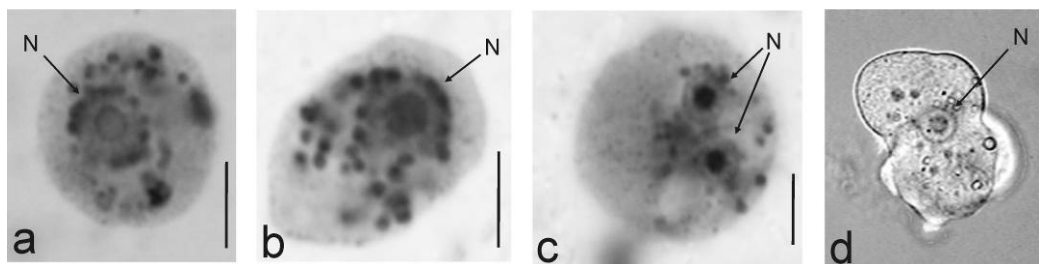
Obr. 16. *Hypotrichomonas* sp. PRA (a – c). AF – přední bičíky; Ax – axostyl; N - jádro; P – pelta; PB – rameno parabasálního tělíska; RF – zpětný bičík; UM – undulující membrána. Preparát zapůjčen I. Čepičkou. Měřítka – 5 μm .



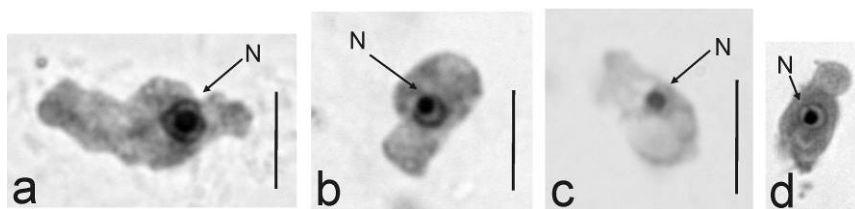
Obr. 17. *Hypotrichomonas* sp. CYCL2 (a – c). AF – přední bičíky; Ax – axostyl; CAx – kapitulum axostylu; N - jádro; P – pelta; RF – zpětný bičík; UM – undulující membrána. Preparát zapůjčen I. Čepičkou. Měřítka – 5 μm .



Obr. 18. *Monocercomonoides* sp. ARCH1 (a), BAT1 (b), BFUM1 (c), RMAD2 (d). Ax – axostyl; F – funis; N – jádro. Preaxostyl a pelta, nejlépe viditelné u obrázku c, nejsou označeny. Je dobře vidět, že různé izoláty se liší v intenzitě obarvení. Měřítko – 5 μ m.



Obr. 19. Měňavky v izolátu RMAD2 obarveno protargolem (a – c), *Endamoeba blattae* nativní preparát (d). N - jádro. Měřítko – 5 μ m. Obrázek (d) získán z internetu z adresy <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/imgaug05/wd/14-parasites3.jpg>.



Obr. 20. Měňavky v izolátu BFUM1 obarveno protargolem (a – c), *Endolimax nana*, nativní preparát (d). N - jádro. Měřítko – 5 μ m. Obrázek (d) získán z internetu z adresy <http://www.k-state.edu/parasitology/625tutorials/FIGendolimax08.jpg>.

4.3. Fylogenetická analýza

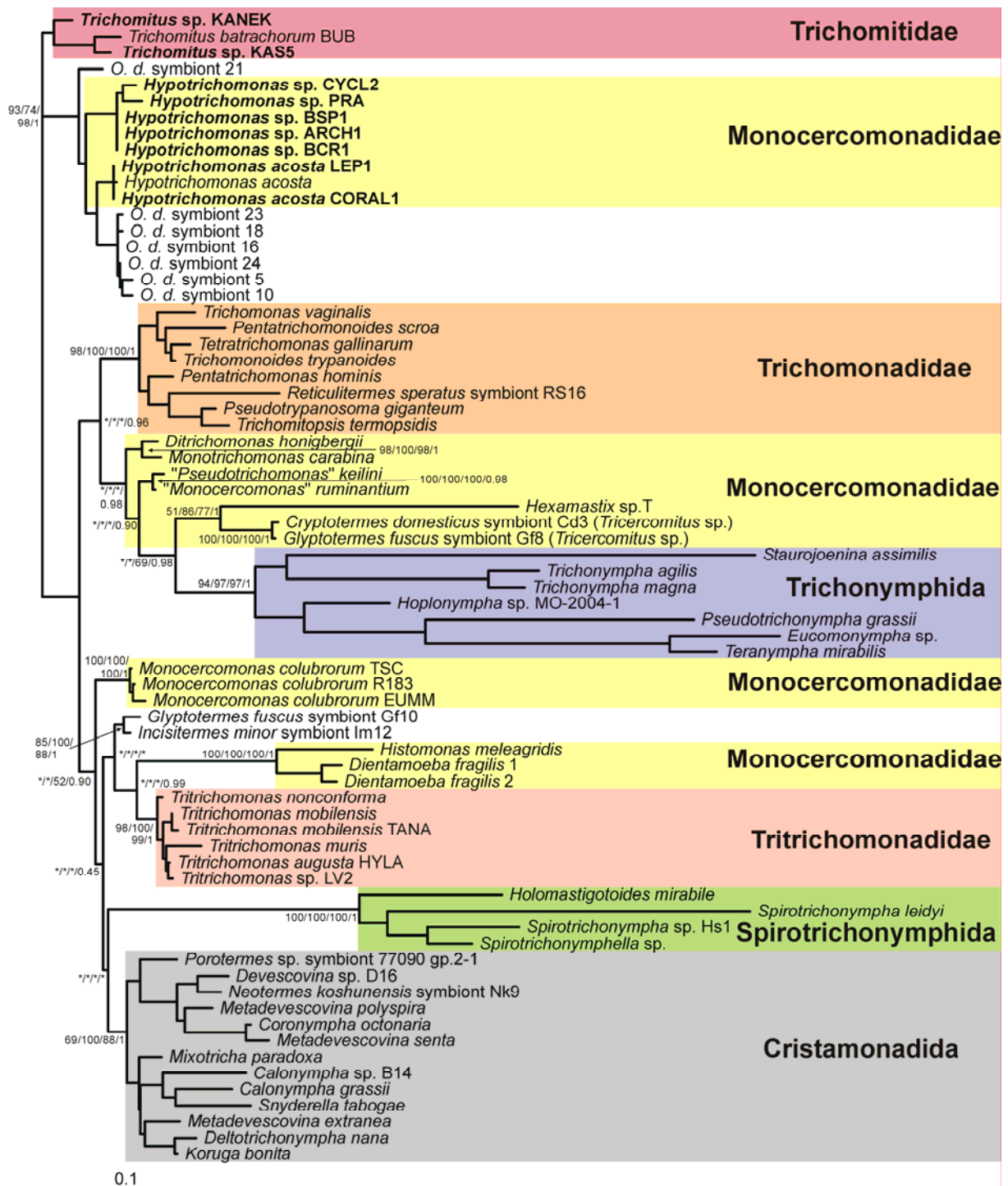
Sestavili jsme fylogenetický strom kmene Parabasala obohacený o naše nové izoláty (viz obr. 21). Topologie odpovídá výsledkům předchozích analýz (viz Hampl *et al.*, 2004), pozice dlouhých větví (tj. Dientamoebinae, Trichonymphida, Spirotrichonymphida a *Hexamastix*) je značně nestabilní a závislá na metodě (stromy konstruované jednotlivými metodami zde neukazujeme). Zjevně se zde projevuje efekt přitahování dlouhých větví (LBA) a hodnoty bootstrapu jsou ve vnitřních uzlech nízké. Větev *Trichomitus* – *Hypotrichomonas* se vytvořila při všech metodách, rod *Hypotrichomonas* je s vysokými hodnotami bootstrapu holofyletický (viz obr. 22.).

Rod *Hypotrichomonas* lze podle fylogenetické pozice rozdělit do šesti skupin:

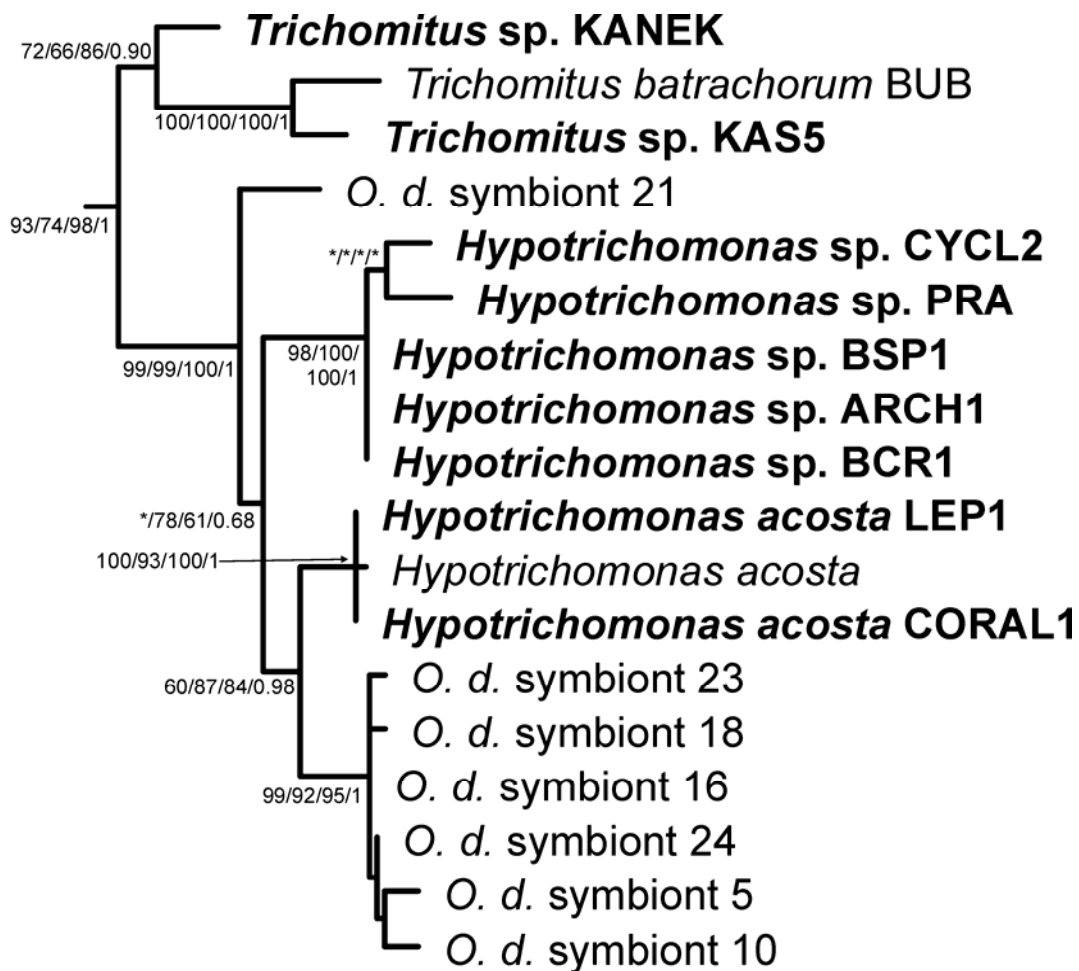
1) izolát CYCL2, 2) izolát PRA, 3) izoláty BCR1, BSP1, ARCH1, 4) izoláty *H. acosta*, LEP1, CORAL1, 5) *Odontotaenius disjunctus* symbiont 21, 6) ostatní *Odontotaenius disjunctus* symbionti. Genetická vzdálenost (myšleno p-distance) jednotlivých skupin se pohybuje v rozmezí 1 – 4,3 % (viz tab. 15).

Tab. 15. Průměrná genetická vzdálenost mezi jednotlivými liniemi rodu *Hypotrichomonas*: ACOSTA – izoláty *H. acosta*, LEP1, CORAL1; CYCL2 – izolát CYCL2; PRA – izolát PRA; SVABI – izoláty BSP1, BCR1, ARCH1; SYMB – *O. d.* symbionti 5, 10, 16, 18, 23, 24; OD21 – *O. d.* symbiont 21.

| | | | | | |
|--------|--------|------|-----|-------|------|
| | ACOSTA | | | | |
| ACOSTA | | CYCL | | | |
| CYCL | 3,2 | | PRA | | |
| PRA | 3,5 | 1,7 | | SVABI | |
| SVABI | 2,8 | 1 | 1,4 | | SYMB |
| SYMB | 2,2 | 3,8 | 4,3 | 3,7 | |
| OD21 | 2,9 | 3,2 | 3,8 | 3,3 | 2,6 |



Obr. 21. Fylogenetický strom kmene sestřený ze sekvencí SSU rDNA metodou maximum likelihood pod modelem TrN + I + Γ. Čísla v uzlech jsou hodnoty: bootstrap MP/bootstrap LS/ bootstrap ML/ Bayesian posterior probability, hvězdičky znamenají bootstrapovou podporu menší než 50 nebo jinou topologii v daném uzlu. Strom není zakořeněný. Nové sekvence jsou zvýrazněny.



Obr. 22. Zvětšená část předchozího fylogenetického stromu s rody *Hypotrichomonas* a *Trichomitus*.

V.

DISKUSE

Zřejmě jako prvním na světě se nám podařilo kultivovat švábí střevní prvoky, což otevírá cestu dalším experimentům. Nejvýznamnějším výsledkem naší práce je zásadní rozšíření znalostí o diverzitě rodu *Hypotrichomonas*. Za jediný validní druh rodu *Hypotrichomonas* byl dosud považován *H. acosta*. Kromě toho, že jsme objevili tři další nové sekvence, všechny dostupné izoláty jsme na základě naší fylogenetické analýzy rozdělili na šest skupin. Genetické vzdálenosti mezi těmito skupinami (1 – 4,3 %) jsou srovnatelné se vzdálenostmi mezi validními druhy rodů *Trichomonas*, *Tetratrichomonas* a *Tritrichomonas* (viz Cepicka *et al.*, 2005; 2006). Vzhledem k tomu, že čtyři z těchto linií představují zároveň i samostatné morfospecies (z toho tři – CYCL2, PRA, BSP nebyly dosud popsány), jsme přesvědčeni, že i zbylé dvě linie tvořené symbionty passalidních brouků představují samostatné druhy. Podle jejich fylogenetické pozice soudíme, že patří také do rodu *Hypotrichomonas*.

Při barvení protargolem, narozdíl od ostatních metod, zůstává výborně zachována prostorová struktura buňky i celkové uspořádání organel. Dnes je přesto barvení protargolem pro svou náročnost poměrně vzácné a pro studium morfologie střevních bičíkovců se téměř nepoužívá. Tato metoda je však nezbytná např. pro popis nových druhů parabasalidů, což znamená, že se nové druhy náležející do tohoto kmene prakticky nepopisují. Studium parabasalidů vyjma druhů *Trichomonas vaginalis* a *Tritrichomonas foetus* tedy stagnuje a je většinou odkázáno jen na metody molekulární taxonomie. Využili jsme proto našich preparátů obarvených protargolem a v současné době na jejich základě popisujeme námi objevené druhy rodu *Hypotrichomonas* a hodláme je publikovat.

Spolehlivě jsme odlišili nové druhy jak morfologicky, tak provedením fylogenetické analýzy na základě sekvencí SSU rDNA. Druh izolovaný z prasete jsme od druhu izolovaného z amerických blaberinů odlišili i fyziologicky (dokázali jsme vylučující se nároky na teplotu prostředí).

Změřili jsme rozměry buněk *H. acosta* a švábích hypotrichomonád z izolátů ARCH1 a BSP1. Potvrdili jsme, že *H. acosta* je výrazně větší než *Hypotrichomonas* sp. ARCH1 a BSP1. Zatímco velikost buněk *H. acosta* je velmi variabilní, buňky druhu *Hypotrichomonas* sp. ARCH1 a BSP1 ze švábů jsou mnohem uniformnější. Protože jsme našli i „tvrdé“ znaky, kterými se od sebe dají jednotlivé druhy rodu *Hypotrichomonas* mnohem snáze odlišit, nepovažujeme velikost buněk za vhodný determinační znak tohoto rodu.

Zajímavé je, že *Hypotrichomonas* sp. (izoláty BSP1, BCR1, ARCH1, BAT1) jsme získali pouze z amerických blaberinů, kdežto zkoumaní zástupci jiných podčeledí tyto prvky neobsahovali. Uvažujeme proto o možnosti specifické mikroflóry blaberinů, ale nemáme ani dostatek dat, ani data ekologicky relevantní, neboť analyzovaní švábi pochází z dlouholetých chovů a není jisté, jestli se nenakazili *Hypotrichomonas* sp. mimo svou domovinu.

Považujeme za překvapivé, že *Hypotrichomonas* sp. CYCL2, izolovaná z kubánského plaza *Cyclura nubila*, patří do jiné fylogenetické linie rodu než druh *Hypotrichomonas acosta*, vyskytující se ve střevech mnoha jiných exotických plazů. Nemůžeme proto vyloučit, že se v některých exotických plazech vyskytují ještě další, dosud neobjevené druhy rodu *Hypotrichomonas*.

Rod *Hypotrichomonas* je příbuzný rodu *Trichomitus* (společně tvoří jednu z pěti hlavních linií kmene Parabasala). Tyto rody se liší strukturou (dokonce přítomností) kosty, která je v klasickém modelu považována za fylogeneticky významnou strukturu. Rod *Trichomitus* má kostu dobře vyvinutou, kdežto rod *Hypotrichomonas* má v mastigontu pouze její rudiment. Jde tedy o dva blízké příbuzné rody, mezi nimiž není známý přechodový vývojový článek. Zajímá nás proto, jakým způsobem je utvářena kosta u námi objevených druhů, neboť by nám znalost ultrastruktury kosty v těchto druzích mohla poodhalit evoluční rozrůzněnost celé této linie parabasalidů.

Stavba kosty u rodu *Hypotrichomonas* je zásadní z hlediska nesouladu molekulárního a morfologického modelu evoluce kmene Parabasala. Proto na základě našich výsledků zhotovil I. Čepička z našich izolátů preparáty pro transmisní elektronový mikroskop. V budoucnu tedy chceme provést detailní elektronmikroskopickou studii ultrastruktury nových druhů tohoto rodu. Přestože vlivem suboptimální fixace vzniklo v preparátech několik artefaktů (především na membránách), přikládáme některé fotografie v kapitole *Přílohy*.

Z obsahu střeva švábů druhu *Rhyarobia maderae* se nám podařilo kultivovat améby neznámého rodu. Předpokládáme, že by se mohlo jednat o rod *Endamoeba*, což by bylo velmi pozitivní, neboť dosud není jasné, do které skupiny tento rod patří. Uvažuje se o tom, že by mohl být příbuzný rodu *Entamoeba*. Doposud jej však nikdo úspěšně neosekvenoval. Případná kultivace rodu *Endamoeba* by výrazně usnadnila jeho osekvenování a stala by se tak dalším velmi významným výsledkem naší práce.

Améba kultivovaná z izolátu BFUM1 nápadně připomíná rod *Endolimax*, ale určením si také nejsme jisti. Pokud skutečně kultivujeme rod *Endolimax*, a pokud nejde o druh *E. nana* (jediný sekvenovaný), mohou případné sekvence pomoci lépe rozřešit fylogenezi skupiny Archamoebae.

Získali jsme i několik izolátů rodu *Monocercomonoides* (Oxymonadea), jehož první a doposud jediná známá sekvence byla publikována zcela nedávno (Hampl *et al.*, 2005).

VI.

SHRNUTÍ

1. Vyšetřili jsme 15 jedinců náležících do deseti druhů švábů nadčeledi Blaberoidea. Podařilo se nám převést do stabilní kultury sedm izolátů z obsahu střeva šesti druhů švábů, jmenovitě *Archimandrita tessellata*, *Blaberus atropos*, *Blaberus craniifer*, *Blaberus* sp., *Byrsotria fumigata* a *Rhyparobia maderae*.
2. Obarvili jsme protargolem šest našich izolátů, což nám umožnilo determinovat prvky obsažené v těchto kulturách.
3. Získali jsme sekvence SSU rDNA tří našich izolátů ze švábů a provedli jsme jejich fylogenetickou analýzu.
4. Ve střevech amerických blaberinů rodů *Archimandrita* a *Blaberus* jsme na základě fylogenetické a morfologické analýzy zjistili přítomnost trichomonády rodu *Hypotrichomonas*. *Hypotrichomonas* izolovanou z amerických blaberinů jsme vyhodnotili jako nový druh a připravili k popisu, který nyní provádíme.
5. Rovněž izoláty z prasete domácího a leguána představují nové druhy rodu *Hypotrichomonas*. V tuto chvíli intenzivně pracujeme na jejich popisu.
6. Izolát LEP1 je prvním nálezem *H. acosta* v žábách (jde o dosud nepublikovaný izolát, který nám poskytl I. Čepička).
7. U rodů *Blaberus*, *Archimandrita*, *Rhyparobia* a *Byrsotria* jsme zjistili přítomnost prvoků rodu *Monocercomonoides*.
8. V případě švába druhu *Byrsotria fumigata* se nám jako prvním podařilo kultivovat z obsahu jeho střeva amébu, patrně rodu *Endolimax*.
9. V případě švába druhu *Rhyparobia maderae* se nám jako prvním podařilo kultivovat z obsahu jeho střeva amébu připomínající rod *Endamoeba*. Tuto amébu jsme kultivovali jak z nymfy, tak z dospělce.

VI.

SUMMARY

1. We examined fifteen individuals from ten species of cockroaches from the superfamily Blaberoidea. We have successfully transformed seven isolates from intestine into stable culture, in particular from cockroach species *Archimandrita tessellata*, *Blaberus atropos*, *Blaberus craniifer*, *Blaberus* sp., *Byrsotria fumigata* and *Rhyparobia maderae*.
2. We stained six our isolates with protargol and we determined some protists present in the isolates.
3. We determined 16S rDNA sequences of three our isolates from cockroaches and performed a phylogenetic analysis.
4. On the basis of a morphologic analysis, we have found a new species of the genus *Hypotrichomonas* (Parabasala) in intestines of American genera of cockroaches, *Archimandrita* and *Blaberus*. At the moment, we are preparing a formal description of the new *Hypotrichomonas* species
5. Isolates from a pig (*Sus scrofa* f. *domestica*) and from a Cuban iguana (*Cyclura nubila*) also represent new species of *Hypotrichomonas*. We are working on their formal description at the moment.
6. The isolate LEP1 from a frog *Leptopelis* sp. is the first record of *H. acosta* in amphibians (the isolate was isolated by I. Čepička).
7. We have found hitherto undetermined species of *Monocercomonoides* (Oxymonada) in cockroach genera *Blaberus*, *Archimandrita*, *Rhyparobia* and *Byrsotria*.
8. We are the first to be successful in cultivating intestinal amoebae from cockroaches, possibly of the genus *Endolimax*, from the intestine of *Byrsotria fumigata*.
9. We also have obtained two isolates of an amoeba, resembling the genus *Endamoeba*, from intestine of the cockroach species *Rhyparobia maderae*. The amoeba was cultivated both from nymph and adult.

-VII-

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

(LIST OF USED LITERATURE)

Akhmanova A, Voncken F, van Alen T, van Hoek A, Boxma B, Vogels G, Veenhuis M, Hackstein JH (1988). A hydrogenosome with a genome. *Nature* **396**: 527-528.

Alberts a kolektiv (2000). *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, Ústí nad Labem.

Boxma B, de Graaf RM, van der Staay GW, van Alen TA, Ricard G, Gabaldon T, van Hoek AH, Moon-van der Staay SY, Koopman WJ, van Hellemond JJ, Tielens AG, Friedrich T, Veenhuis M, Huynen MA, Hackstein JH (2005). An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* **434**: 74-79.

Brugerolle G (1976). Cytologie ultrastructurale, systematique et evolution des Trichomonadida. *Annales de la Station Biologique Besse-en-Chandesse* **10** : 1-57.

Brugerolle G (1986). Structural diversity of trichomonads as the basis for systematic and evolutionary considerations. *Acta Universitatis Carolinae – Biologica* **30**: 199-210.

Brugerolle G (1991). Cell organization in free-living amitochondriate heterotrophic flagellates. In Patterson DJ, Larsen J (eds.): *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. Clarendon Press, Oxford. pp 133-148.

Brugerolle G, Viscogliosi E (1994). Organization and composition of the striated roots supporting the Golgi apparatus, the so-called parabasal apparatus, in parabasalid flagellates. *Biology of the Cell* **81**: 277-285.

Brugerolle G (2001). Morphological characters of Spirotrichonymphids: *Microjoenia*, *Spirotrichonymphella* and *Spirotrichonympha* symbionts of the Australian termite *Porotermes grandis*. *European Journal of Protistology* **37**: 103-117.

Brugerolle G, Lee JJ (2002). Phylum Parabasalia. In Lee JJ, Leedale GF, Bradbury PC (eds.): An Illustrated Guide to the Protozoa. Volume II, 2nd edition. Society of Protozoologists, Lawrence. pp 1196-1250.

Brugerolle G, Bordereau C (2004). The flagellates of the termite *Hodotermopsis sjoestedti* with special reference to *Hoplonympha*, *Holomastigotes* and *Trichomonoides trypanoides* n. comb. *European Journal of Protistology* **40**: 163-174.

Brugerolle G, Silva-Neto ID, Pellens R, Grandcolas P (2003). Electron microscopic identification of the intestinal protozoan flagellates of the xylophagous cockroach *Parasphaeria boleiriana* from Brazil. *Parasitology Research* **90**: 249-256.

Camp RR, Mattern CFT, Honigberg BM (1974). Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps and Dobell. I. Electronmicroscopic observations of the binucleate stages. II. Taxonomic position and revision of the genus. *Journal of Protozoology* **21**: 69-82.

Cavalier-Smith T (2003). The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonada, Parabasalia, *Carpediemonas*, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their evolutionary affinities and new higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1741-1758.

Cepicka I, Kutišová K, Tachezy J, Kulda J, Flegr J (2005). Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Veterinary Parasitology* **128**: 11-21

Cepicka I, Hampl V, Kulda J, Flegr J (2006). New evolutionary lineages, unexpected diversity and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, in press.

Čepička I, Neustupa J, Hampl V (2005). Protistologie. Přednáškový cyklus v rámci bakalářského studia na PřF UK.

Das Gupta B (1936). Observation on the flagellates of the genera *Trichomonas* and *Eutrichomastix*. *Parasitology* **28**: 195-201.

Dobell C, Leidlaw PP (1926). On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other parasitic amoebae. *Parasitology*. **18**: 283-318.

Farmer MA (1993). Ultrastructure of *Ditrichomonas honigbergii* n.g., n.sp. (Parabasalia) and its relationship to amitochondrial protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **40**: 619-626.

Gerbod D, Sanders E, Moriya S, Noël C, Takasu H, Fast NM, Delgado-Viscogliosi P, Ohkuma M, Kudo T, Capron M, Palmer JD, Keeling PJ, Viscogliosi E (2004). Molecular phylogenies of Parabasalia inferred from four protein genes and comparison with rRNA trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 572-580.

Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696-704.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposia Series* **41**: 95-98.

Hampl V, Cepicka I, Flegr, J, Tachezy J, Kulda J (2004). Critical analysis of the topology and rooting of the parabasalian tree. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 711-723.

Hampl V, Horner DS, Dyal P, Kulda J, Flegr J, Foster PG, Embley TM (2005). Inference of the phylogenetic position of oxymonads based on nine genes: support for metamonada and excavata. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 2508-2518.

Hampl V, Vrlik M, Cepicka I, Pecka Z, Kulda J, Tachezy J (2006). Affiliation of *Cochlosoma* to trichomonads confirmed by phylogenetic analysis of the small-subunit rRNA gene and a new family concept of the order Trichomonadida. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 305-312.

Hollande A, Carruette-Valentin J (1971). Les Atractophored, l'induction du fuseau et la division cellulaire chez les Hypermastigines. Etude infrastructurale et révision systématique des Trichnymphines et des Spirotrichonymphines. *Protistologica* **7**: 5-100.

Honigberg BM (1963). Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida. *Journal of Protozoology* **10**: 20-63.

Hoyte HMD (1961). The protozoa occurring in the hind-gut of cockroaches. I. Responses to changes in environment. *Parasitology* **51**: 514-436.

Kodrík D (2004). Fyziologie hmyzu – učební texty. EntÚ AVČR a BF JČU.

Kulda J (1961). Flagellates from the cloacae of czechoslovak amphibians and reptiles. *Proceedings of the First International Conference on Protozoology* 582-590.

Kulda J (1965). Studie o morfologii, kultivaci a testování virulence bičíkovců čeledi Trichomonadidae. Kandidátská dizertační práce. PšF UK, Praha.

Kulda J, Nohýnková E, Ludvík J (1986). Basic structure and function of the trichomonad cell. *Acta Universitatis Carolinae Biologica* **30**: 181-198.

Lee JJ (1960). *Hypotrichomonas acosta* (Moskowitz) gen. nov. from reptiles. I. Structure and division. *Journal of Protozoology* **7**: 393-401.

Lo N, Tokuda G, Watanabe H, Rose H, Slaytor M, Maekawa K, Bandi C, Noda H (2000). Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Current Biology* **10**: 801-804.

Mattern CFT, Daniel WA, Honigberg BM (1969). Structure of *Hypotrichomonas acosta* (Moskowitz) (Monocercomonadidae, Trichomonadida) as revealed by electron microscopy. *Journal of Protozoology* **16**: 668-685.

Moskowitz N (1951). Observations on some intestinal flagellates from reptilian host (Squamata). *Journal of Morphology* **89**: 257-321.

Navarathnam ES (1971). *Hypotrichomonas avium* n. sp. from the bird *Cryptoplectron erythrorhynchum*. *Rivista di Parassitologia* **31**: 251-254.

Posada D, Crandall KA (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**: 817-818.

Semans FM (1939). Protozoan parasites of the Orthoptera, with special reference to those of Ohio. II. Description of the protozoan parasites recognized in this study. *Ohio Journal of Science* **39**: 157-177.

Semans FM (1943a). Protozoan parasites of the Orthoptera, with special reference to those of Ohio. IV. Classified list of the protozoan parasites of the Orthoptera of the World. Classes Mastigophora, Sarcodina & Sporozoa. *Ohio Journal of Science* **43**: 221-234.

Semans FM (1943b). Protozoan parasites of the Orthoptera, with special reference to those of Ohio. IV. Classified list of the protozoan parasites of the Orthoptera of the World. Classes Mastigophora, Sarcodina & Sporozoa (continued). *Ohio Journal of Science* **43**: 271-276.

Simpson AGB, Patterson DJ (1999). The ultrastructure of *Carpodiemonas membranifera* (Eukaryota) with reference to the “excavate hypothesis“. *European Journal of Protistology* **35**: 353-370.

Simpson AGB, Roger AJ (2004). The real ‘kingdoms’ of eukaryotes. *Current Biology* **14**: R693-R696.

Stein F (1854). Die Infusoriensthier auf ihre Entwicklungsgeschichte untersucht. Leipzig.

Swofford, DL (2002). PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4.0b10., Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

Tamura K, Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 512-526.

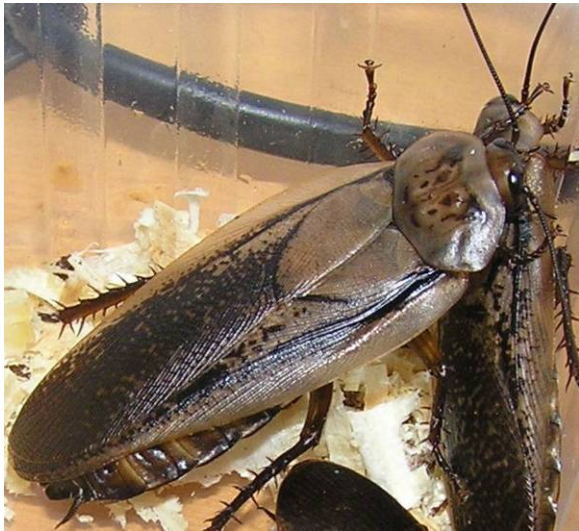
Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.

Turner G, Müller M (1983). Failure to detect extranuclear DNA in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Journal of Parasitology* **69**: 234-236.

Viscogliosi E, Brugerolle G (1994). Striated fibers in trichomonads: costa proteins represent a new class of proteins forming striated roots. *Cell Motility and Cytoskeleton* **29**: 82-93.

-VIII- PŘÍLOHY

Fotogalerie některých námi studovaných švábů



Obr. 23. *Rhyparobia maderae* (adult).



Obr. 24. *Panchlora nivea* (adult).



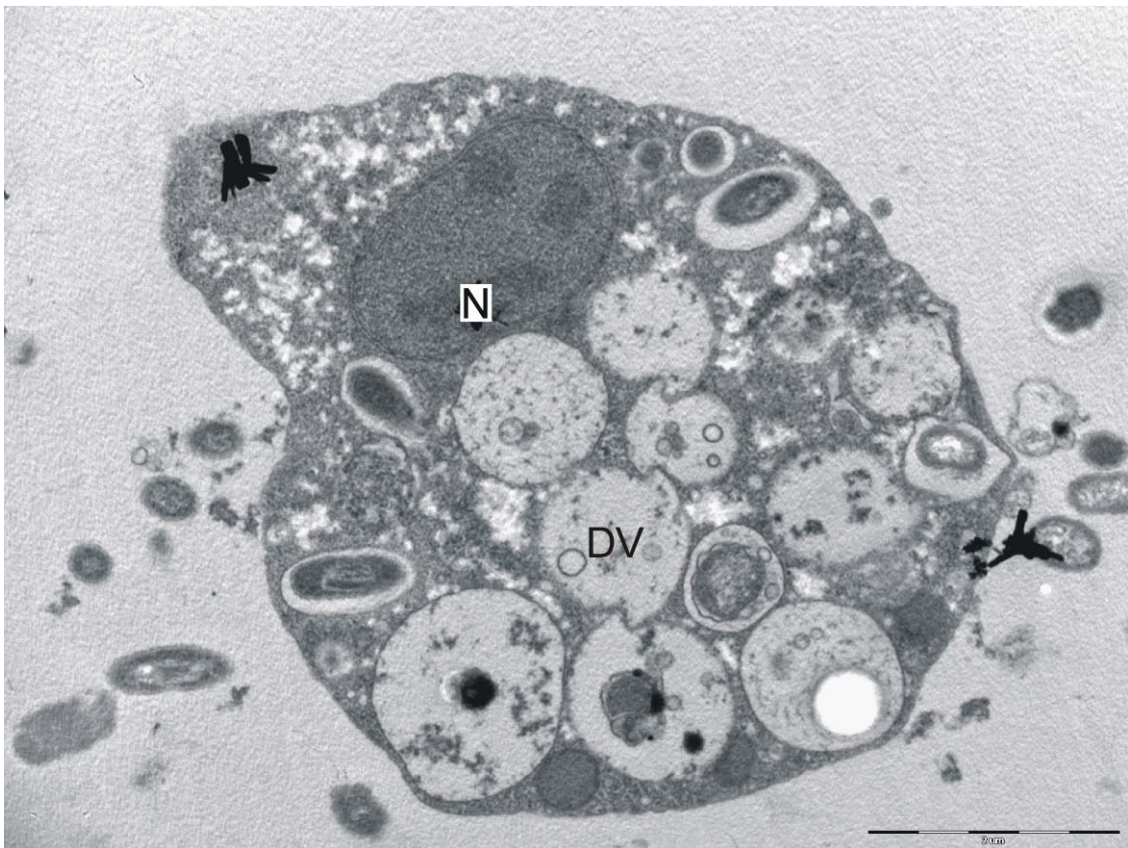
Obr. 25. *Byrsotria fumigata* (1 juv. jedinec a 2 adultní)



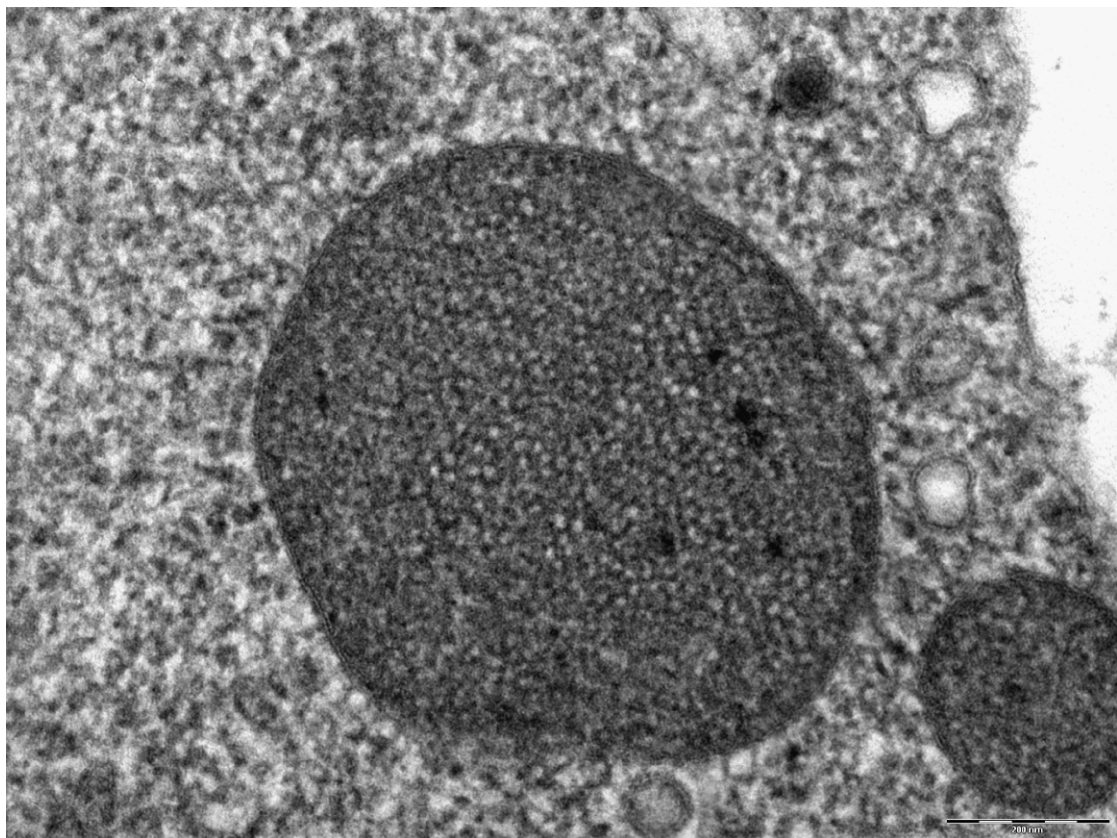
Obr. 26. *Ergaula capucina* (juv. jedinec).



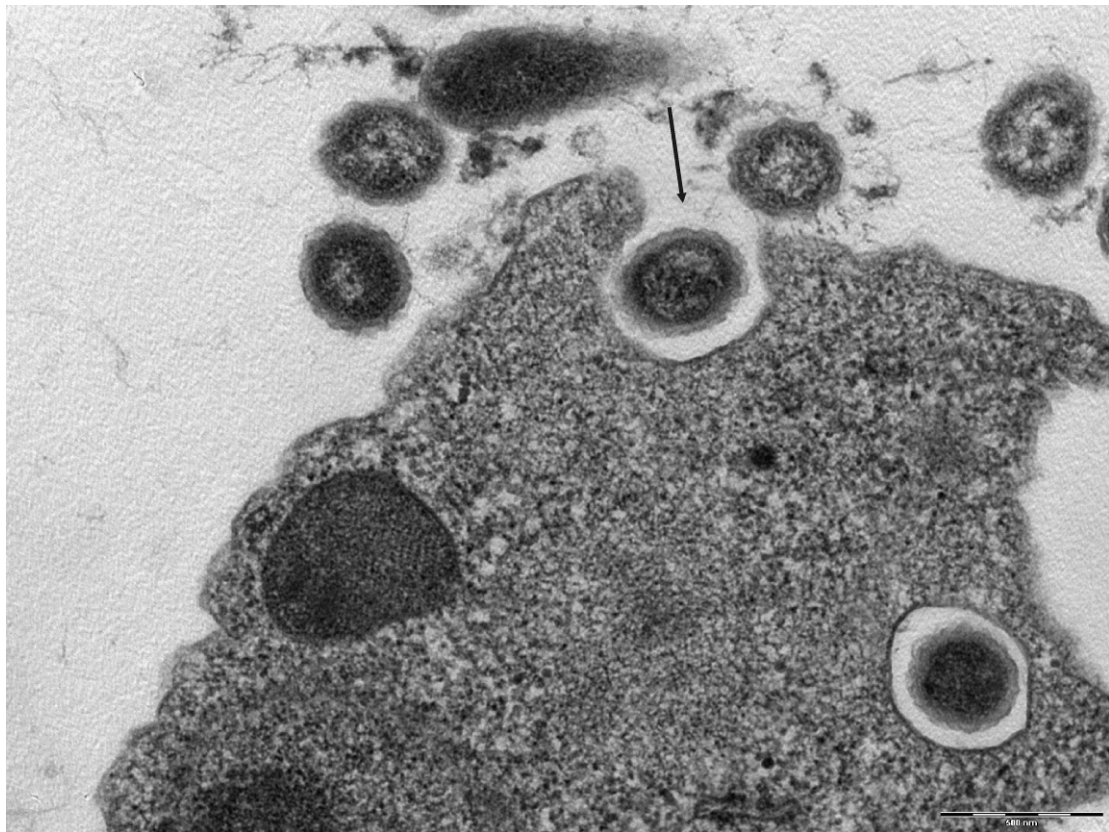
Obr. 27. *Nyctotherus ovalis* z *Archimandrita tessellata*.



Obr. 28. Fotografie *Hypotrichomonas* sp. BCR1 z transmisního elektronového mikroskopu. Příčný průřez buňkou. DV – potravní vakuola; N- jádro. Pořízeno I. Čepičkou.



Obr. 29. Fotografie *Hypotrichomonas* sp. BCR1 z transmisního elektronového mikroskopu. Hydrogenosom. Pořízeno I. Čepičkou.



Obr. 30. Fotografie *Hypotrichomonas* sp. BCR1 z transmisního elektronového mikroskopu. Příčný průřez buňkou. Šipkou je označena právě fagocytovaná bakteriální buňka. Pořízeno I. Čepičkou.



Obr. 31. Fotografie *Hypotrichomonas* sp. BCR1 z transmisního elektronového mikroskopu. Příčný průřez buňkou. Zřetelně je vidět pelta a mastigont. Pořízeno I. Čepičkou.

-IX- SLOVNÍČEK POJMŮ A ZKRATEK

Atraktovor – mikrotubulární organizační centrum dělicího vřeténka

Bayes – Bayesova metoda

Biologická evoluce – Dlouhodobý, samovolně probíhající proces, v jehož průběhu vznikají či jednorázově vznikly ze systémů neživých systémy živé, a tyto živé systémy se pak dále vyvíjí a vzájemně diverzifikují.

COII – mitochondriální gen cytochrom oxidoreduktáza 2

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

DNTP – deoxyribonukleotidy (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). Jednotky, z nichž DNA-polymeráza syntetizuje komplementární vlákno DNA

Fylogeneze – viz. biologická evoluce

Holofyletický taxon – taxon, u kterého známe předka a jeho potomky

Lameliformní undulující membrána – zpětný bičík je asociován s lamelovitým výběžkem cytoplasmatické membrány

Ledová kyselina octová – koncentrovaná kyselina octová (100%)

LS – metoda nejmenších čtverců podle Fitch-Margoliash (least squares)

Master mix – roztok pro PCR, chybí v něm pouze izolovaná DNA

ML – metoda maximální věrohodnosti (maximum likelihood)

MP – metoda maximální parsimonie (maximum parsimony)

Monofyletický taxon – soubor taxonů sdílejících synapomorfii (určitou kategorii homologických znaků), pocházející z jednoho společného předka

Morfospecies – druhy, které se dají odlišit morfologicky

Negativní kontrola – vzorek bez DNA, slouží ke zjištění, zda master mix nebyl při přípravě kontaminován

Parafyletický taxon – taxony definované sympleziomorfií, tedy znakem, který sdílí více různých organismů a který může a nemusí indikovat společného předka

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

Pelet – pevný zbytek, který zůstane po centrifugaci

Polyfyletický taxon – taxony pocházející z více různých předků

Polyxenická kultura – kultura, v níž jsou přítomny i další druhy mikroorganismů, zejména bakterie

Pozitivní kontrola – do směsi pro PCR přidáme izolát DNA, o němž víme, že PCR z něj poskytne fragmenty požadované délky. Slouží k odhalení, zda je PCR dobře namíchaná

Preaxostyl – cytoskeletární struktura specifická pro oxymonády

RNA – ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

RPM – počet otáček za minutu

SSU – malá podjednotka ribosomu (small subunit), která se skládá z rRNA a proteinů

SSU rDNA – DNA kódující gen pro RNA malé ribosomální podjednotky

Supernatant – kapaliný roztok, který zbyde po centrifugaci

TAE pufr – tris-acetát-EDTA pufr

Taq polymeráza – termostabilní DNA polymeráza získaná z bakterie *Thermophilus aquaticus*

TBR – tree bisection reconnection (algoritmus pro “tree swapping“)

TrN + I + Γ – evoluční model Tamura a Nei (1993) s invariantami a gamma korekcí