

Středoškolská odborná činnost 2006/2007

Obor 04 – biologie

Oxymonády a parabasalidi ve střevech vybraných skupin hmyzu

Autor:

Martin Volf

Gymnázium Elišky Krásnohorské, Ohradní 55,
140 00 Praha, VIII

Konzultanti práce:

Mgr. Ivan Čepička Ph.D.

Mgr. Martin Kostka

(Přírodovědecká fakulta UK, Praha)

Praha, 2007

Obsah	str.
1. Úvod	3
1.1. Prvoci	3
1.2. Hmyz	6
2. Materiál a metody	9
2.1. Chov hmyzu	9
2.2. Média pro izolaci a kultivaci prvoků	9
2.3. Izolace prvoků	9
2.4. Kultivace střevních bičíkovců	10
2.5. Barvení prvoků a optická mikroskopie	11
2.6. Izolace DNA	12
2.7. Elektroforéza	12
2.8. Amplifikace SSU rDNA	13
2.9. Příprava vzorků na klonování, přímou sekvenaci	14
2.10. Klonování a izolace plasmidu	15
2.11. Sekvenační reakce, přečištění produktu a vlastní sekvenace	16
2.12. Vyhodnocování sekvencí	17
2.13. Fylogenetické analýzy	18
3. Výsledky a diskuse	19
3.1. Vyšetření hostitelé a kultivace	19
3.2. Optická mikroskopie	21
3.3. Sekvence SSU rDNA	27
3.4. Fylogenetické analýzy	28
4. Závěr	32
5. Použitá literatura	32

1. Úvod:

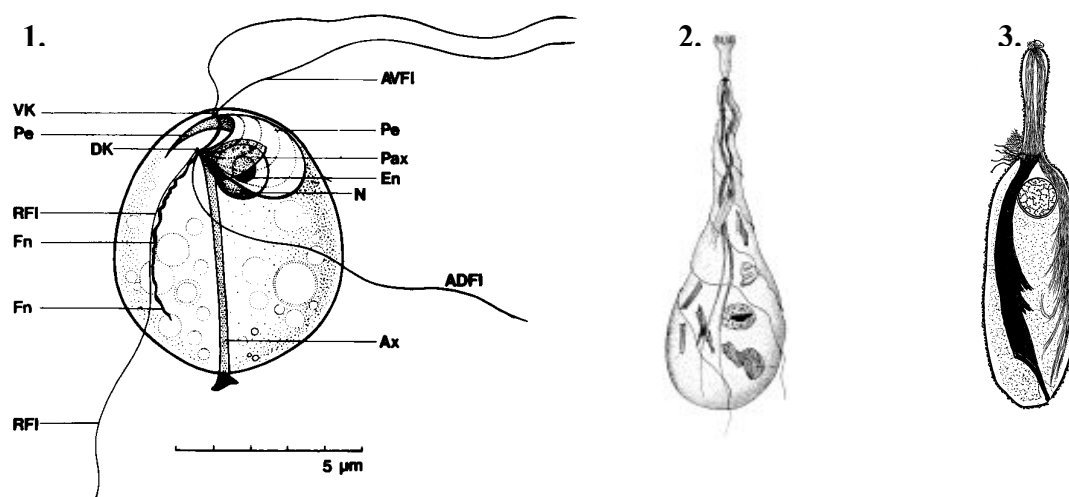
Cílem mého studia bylo přispět k poznatkům o střevních bičíkovcích ze skupin Oxymonadea a Parabasala. Obě tyto skupiny prvoků jsem zkoumal v doposud jen málo probádaném prostředí – ve střevech hmyzu. To bylo pro mne obzvláště zajímavé, protože entomologie vždy patřila k mým zájmům. Ke studiu jsem použil různé druhy brouků a termitů, které jsem choval. Zvolené skupiny hmyzu byly vybrány mimo jiné pro svou dřevožravost, díky které u nich bylo možné předpokládat přítomnost většího množství symbiotických bičíkovců.

Tato práce byla realizována v rámci projektu ESF CZ.04.3.07/3.1.01.1/0051 „Otevřená věda“, který je určen pro středoškolské studenty. Díky tomuto projektu jsem se zapojil do protistologického výzkumu na katedrách zoologie a parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Mými školiteli a konzultanty byli po celou dobu Mgr. Ivan Čepička Ph.D. a Mgr. Martin Kostka, za což bych jim chtěl na tomto místě poděkovat.

1.1. Prvoci:

Oxymonády (Oxymonada) jsou skupinou bičíkovců, která byla poprvé popsána Leidym v roce 1877. Žijí jako mikroaerofilové ve střevech hmyzu, především hmyzu xylofágního. Vyjimku tvoří pouze rod *Monocercomonoides*, jehož zástupci žijící ve střevech obratlovců. Oxymonády se často vyskytují ve velkém množství a u svých hmyzích hostitelů tvoří důležitou část střevního společenstva. Výživa probíhá u těchto prvoků fagocytózou nebo pinocytózou (Hausmann, Hülsmann 1996).

Flagelární aparát, tzv. mastigont (tj. bičíky, jejich basální tělíska a přidružený cytoskelet), leží blízko jádra a je s ním asociován. Dohromady tvoří karyomastigont. Mastigonty jsou čtyřbičíkaté, bičíky jsou typicky organizovány do dvou oddělených párů. Dva páry basálních tělísek jsou odděleny peltou, což je zvláštní mikrotubulární struktura charakteristická i pro některé další skupiny prvoků. Někdy je bičík přichycen k povrchu buňky a tvoří tak undulující membránu. Cytostom (buněčná ústa) ani s ním sdružený bičík není vytvořen. Charakteristická je přítomnost axostylu - tyčinkovité struktury, která je u mnoha druhů pohyblivá a sestává z paralelních řad mikrotubulů. Prochází středem těla a je po celé délce stejně široký. U některých zástupců je vytvořeno rostellum, chobotovitý výběžek, sloužící k přichycení k povrchu střeva hostitele. Pod peltou se nachází preaxostyl a kryje vrchní část jádra. Preaxostyl je podobně jako axostyl tvořen mikrotubuly. V jeho okolí se nachází množství granulí se zásobními polysacharidy. Jádro je oválného tvaru a obsahuje kulovitý jadérko. (Kulda a Nohýnková 1978).

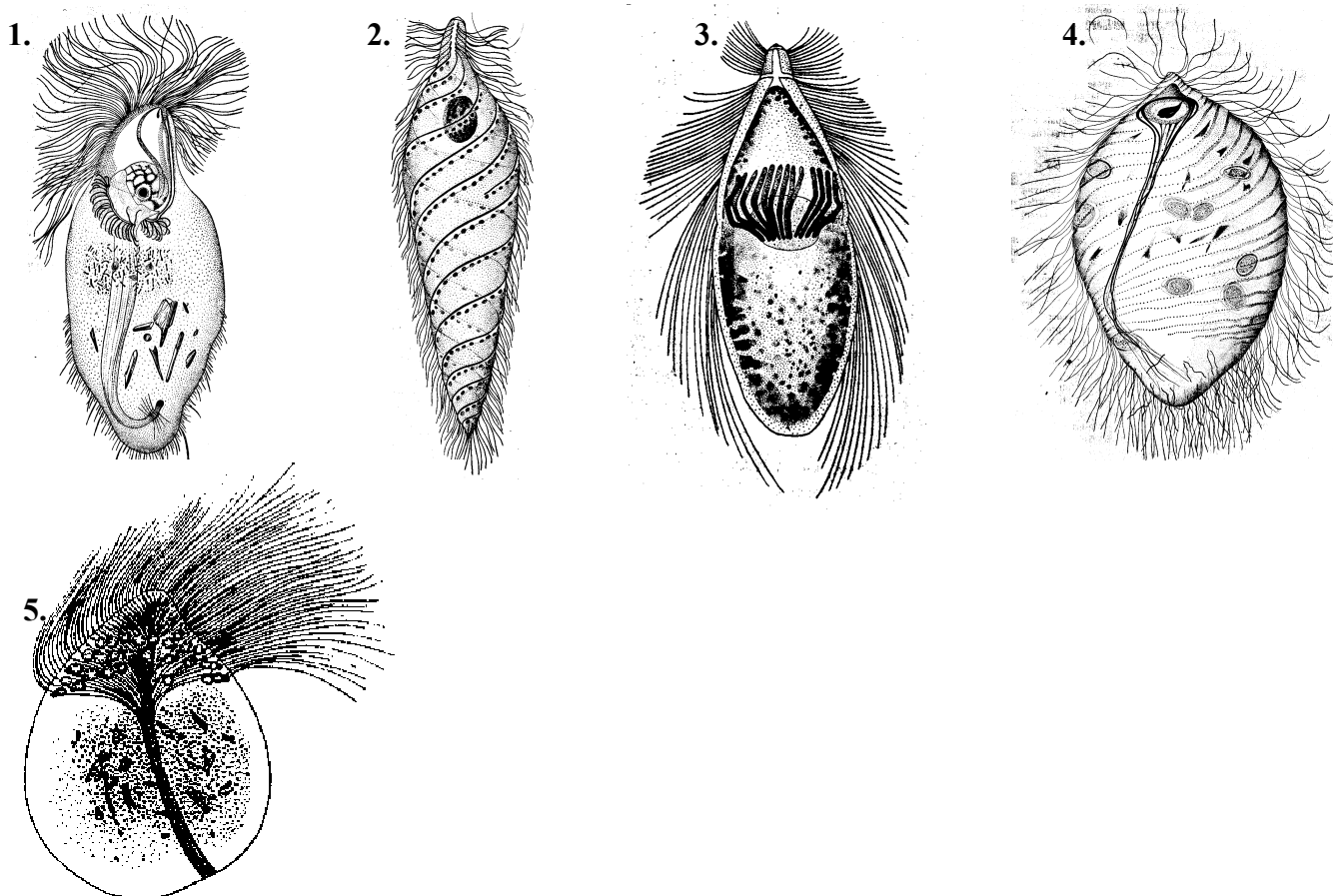


obr. 1: 1. *Monocercomonoides caviae*. AVFI, ADFI, RFI - bičíky, VK - ventrální kinetosomální komplex, DK -dorsální kinetosomální komplex, Fn - funis, Ax - axostyl, N - jádro, En - endozóm, Pax - preaxostyl, Pe – pelta . Podle Kulda a Nohýnková 1978
2. *Pyrsonympha*, 3. *Oxymonas*. Podle Hampl 2005.

Při dělení jader je dělicí vřetenko umístěno uvnitř jádra a mitóza probíhá aniž byla porušena jaderná membrána (tzv. kryptomitóza). Golgiho komplex, peroxysomy a mitochondrie chybí. U některých druhů (např. rod *Pyrsonympha*) je, podobně jako u trichonymfydů (viz dále), známa symbióza s bakteriemi, zvláště spirochetami. Rozmnožování je u oxymonád trojího typu. Prvoci rodu *Notila* jsou diploidní po celou dobu svého asexuálního života. Při pohlavním rozmnožování splynou dva morfologicky nerozlišitelní jedinci a v jejich jádrech proběhne jedno meiotické dělení. Výsledkem jsou dvě samčí a dvě samičí jádra. Samčí jádro se oddělí od axostylů, zatímco samičí jádro s nimi zůstává spojeno. Jádra následně splynou v tetraploidní zygotu. Axostyly splývají také. Tetraploidní zygota se poté rozdělí na dvě diploidní buňky, čímž se celý cyklus ukončí (Grell 1967, podle Dryer 1989). Jiné oxymonády, například rody *Saccinobaculus* a *Oxymonas*, jsou po většinu svého života haploidní. Při tvorbě gamet probíhá v těchto haploidních buňkách jedno mitotické dělení. Během pohlavního rozmnožování splynou dvě morfologicky totožné buňky a vznikne diploidní zygota. Axostyly také splývají. Pokud navzdory rozdělení jádra nedojde ke vzniku dvou buněk (gamet), může dojít k autogamii. V tomto případě vzniká zygota následným splnutím jader. V obou případech se zygota po dalším meiotickém dělení rozpadne na dvě dceřiné haploidní buňky (Grell 1967, podle Dryer 1989). U jiných druhů oxymonád nebylo pohlavní rozmnožování zaznamenáno.

Skupinou, která je příbuzná oxymonádám, jsou Parabasala. Jsou to bičíkovci, tvořící jednotnou a morfologicky dobře definovanou skupinu. Mastigont této skupiny má charakteristické uspořádání basálních tělísek a cytoskeletu a je oddálen od jádra. U skupiny Parabasala se setkáváme s největší variabilitou počtu bičíků - od žádného až po několik tisíc. Původní je ale zřejmě vybavení čtyřmi bičíky, kdy tři z nich míří vpřed a jeden je zpětný. U některých druhů je tento zpětný bičík asociován s cytoplazmatickou lamelou a vzniká tak undulující membrána. Undulující membrána je většinou podložena silnou žíhanou fibrilou - kostou. Ta pravděpodobně slouží k tlumení nárazů undulující membrány. U několika druhů je kosta kontraktilní. Pro Parabasala je také typická přítomnost nepohyblivých axostylů. Mohutně vyvinutý Golgiho komplex asociovaný s jádrem pomocí žíhaných parabasálních fibril tvoří parabasální aparát, podle kterého dostala celá skupina jméno. Přední část axostylu objímá jádro a je na ní napojena další mikrotubulární struktura, pelta, která obkružuje basální tělíska bičíků. Cytostom není vyvinut, fagocytóza probíhá na celém povrchu buňky. typické mitochondrie chybí, ale u všech skupin jsou přítomny hydrogenosomy, což jsou modifikované mitochondrie. Bičíkovci této skupiny jsou převážně endozoičtí (vyjimku tvoří například volně žijící rod *Ditrichomonas*). Někteří z těchto prvoků patří také mezi významné parazity. Buněčný cyklus obvykle zahrnuje pouze volně pohyblivé trofozoity. Právě cysty byly zaznamenány pouze u několika druhů (Hausmann, Hülsmann 2003).

Z celé skupiny Parabasala byli z hlediska mé práce nejvýznamnější prvoci řádu označovaného jako Hypermastigida (ve skutečnosti se ale jedná o polyfyletickou skupinu). Pro ty je charakteristický velký počet bičíků vycházejících z předního konce těla. Bičíky se pohybují v synchronizovaných vlnách. Parabasální aparáty mají podobu mnohonásobných nebo keřovitě větvených jednotek. Golgiho komplex je obvykle velký a dobře patrný. Axostyly, kterých může být větší počet, jsou jednotlivé, oddělené orgány, nebo jsou všechny spojeny v jeden celek. Mitotické vřetenko je při dělení umístěno mimo jádro, což je v rámci eukaryot dost neobvyklé. Tito prvoci žijí výlučně ve střevech xylofágního hmyzu, kde svému hostiteli pomáhají štěpit celulózu. Zde spolu s nimi žijí také speciální druhy hub a bakterií, které jsou také schopny štěpit celulózu. Některé z těchto bakterií, zvláště spirochety, žijí jako episymbionti i endosymbionti samotných prvoků. Prvoci mají často vymezené plochy, kam mohou episymbiotické bakterie nasedat. Umístění bakterií na povrchu buňky je druhově specifické (Hausmann, Hülsmann 2003). Tyto bakterie pravděpodobně samotným prvokům pomáhají štěpit celulózu. Bylo zaznamenáno několik případů, kdy tyto bakterie dokonce pomáhají prvokům v pohybu a slouží v podstatě jako bičíky. Následují vyobrazení některých hmyzích parabasalidů (Maas, Radek 2006).



obr. 2: 1. *Joenia*, 2. *Spirotrichonympha*, 3. *Trichonypha*, 4. *Holomastigotoides*, 5. *Calonympha*. Podle Brugerolle a Lee 2000

1.2. Hmyz:

Pro mou práci byli kromě samotných prvoků důležití i jejich hostitelé, vybral jsem si termity a různé skupiny brouků, ale soustředil jsem se především na dvě skupiny hmyzu - termity a zlatohlávky. Pro výběr těchto dvou skupin jsem měl několik důvodů. Za prvé nejsou střevní prvoci u těchto skupin hmyzu (a vlastně hmyzu obecně) příliš prozkoumání a navíc se jedná v obou případech (u zlatohlávků mám na mysli larvy) o hmyz, u který se žíví potravou obsahující celulózu a bylo možné proto předpokládat přítomnost symbiotických bičíkoveců, kteří hostiteli celulózu pomáhají štěpit. Bylo proto pravděpodobné, že výzkum přinese zajímavé výsledky. Druhým důvodem byl relativně snadný chov zlatohlávků a termitů v zajetí, což umožňovalo přísun dostatečného množství pokusného materiálu.

Termiti jsou drobný hmyz dosahující velikosti 2 až 20mm. Žijí eusociálně v koloniích v tropických a subtropických oblastech světa. Malá hlava nese dobře vyvinuté kousací ústní ústrojí.

Zadeček je u samců zakončen styly a cerky, u samic pouze cerky. Všechny ostatní morfologické, anatomické a bionomicko-ekologické znaky jsou značně variabilní.

U termitů existují různé polymorfní kasty, typické pro společenský hmyz. Lze vymezit dvě hlavní kasty - reprodukční a sterilní. Primárně reprodukční kasta je okřídlená, se silně sklerotizovaným tělem a jejím úkolem je zakládat nové kolonie. Těmto jedincům obvykle po oplození odpadnou křídla a samicím zbytní zadeček. Jinou reprodukční kastou jsou náhradní jedinci, kteří jsou méně sklerotizováni a mají v různém stupni redukovaná křídla. V koloniích se objevují v případě úhynu jednoho nebo obou pohlavních jedinců. Do sterilních kast patří bezkřídlí dělníci a vojáci. Dělníci zabezpečují především potravu a péči o potomstvo, vojáci se starají o bezpečnost kolonie. Toto schéma je jen obecné a u různých druhů se může lišit (Lang a kol., 1971).

Z vajíček kladených samicí se líhnou nymfy, které se 4krát až 10krát svlékají. Od třetího instaru se mohou tyto nediferenciované nymfy vyvinout v příslušníka kterékoli kasty. Tento vývoj závisí na kvalitě potravy a působení specifických hormonů.

Termiti si obvykle budují velká hnízda na zemi, pod zemí i na stromech. Tato termitiště jsou budována z písku, hlíny a ze dřeva, které jsou stmeleny slinami termitů, což zvyšuje jejich pevnost. Jako hlavní potrava slouží termitům dřevo. Někdy proto působí značné hospodářské škody. Celulózu, která je ve vysoké míře obsažena v jejich potravě, jim pomáhají štěpit symbiotičtí prvoci, bakterie a houby.

Zlatohlávci (Cetoninae) patří mezi listorohé brouky. Horní pysk a kusadla nejsou shora viditelné, protože je kryje čelní štítek - clypeus. Tykadla jsou desetičláneková, zakončená vějířkem ze tří pohyblivých listů. Zásadně se pak Cetoninae liší od ostatních brouků tím, že okraje krovek za ramenními hrbolky mají podramenní výkrojek, kterým brouk za letu prostrčí křídla. Všichni zlatohlávci létají tak, že krovky jsou za letu zavřené, nejvýše lehce pootevřené. Poslední zadečkový článek (pygidium) je většinou velký, shora dobře viditelný. Larvy zlatohlávků mají silně sklerotizovanou hlavu vybavenou mohutným kousacím ústrojím (Rataj, 1996). Zlatohlávci mají celkem tři larvální instary. Na konci třetího instaru si larva vyrobí ze substrátu oválný kokon, ve kterém se zakuklí. Vývoj v kokonu trvá od dvou měsíců až do jednoho a půl roku.

Ačkoli jsou zlatohlávci rozšířeni na mnoha místech světa, je centrem jejich výskytu



obr. 3: *Neotermes* - voják ,
podle tomletermite.over-blog.com

centrální Afrika, kde žijí největší a nejkrásněji zbarvené druhy (samci rodu *Goliathus* dosahují délky přes 110 mm). Zlatohlávci jsou brouci s převážně denní aktivitou. Imága se živí nektarem, mizou nebo sladkým ovocem. Larvám, které žijí pod zemí nebo ve stromových dutinách a pařezech, slouží jako potrava listová hrabanka a trouchnivé dřevo (Čuřík, 2000).



obr. 4: *Mecynorrhina ugadensis*,
podle coeloptera.wz.cz



obr. 5: *Cetonischema aeruginosa*,
podle hlasek.com



obr. 6: *Eudicella euthalia*, vlastní odchov



obr. 7: *Eudicella ethiopica*, vlastní odchov



obr. 8: *Chelorrhina polyphemus confluens*,
vlastní odchov



obr. 9: *Chelorrhina polyphemus confluens*,
vlastní odchov, srovnání larvy a imága



obr. 10: *Stephanorrhina guttata*,
vlastní odchov



obr. 11: *Cetonia aurata* – larva,
podle zooex.baikal.ru

2. Materiál a metody

2.1. Chov hmyzu

Termiti byli chováni ve tmě v litrových dózách za pokojové teploty a zvýšené vlhkosti. Jako potrava jim bylo podáváno suché palivové dřevo. Zlatohlávci byli chováni při teplotě cca 25 °C v osvětlených teráriích s listovou hrabankou, která byla pravidelně zvlhčována. Imága byla krmena banány, larvy se živily bukovou a dubovou hrabankou a ztrouchnivělým dřevem.

2.2. Média pro izolaci a kultivaci prvoků

Použité chemikálie:

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

Pro izolaci a kultivaci prvoků bylo použito dvoufázové médium podle Dobell-Leidlaw. Toto médium se skládá ze dvou složek - pevné a tekuté. Složky jsou připravovány odděleně a vlastní médium je zkompletováno až krátce před použitím. Pevnou složku tvoří 1,5 ml

koagulovaného koňského séra. Sérum se nechá koagulovat v šikmo položených skleněných zkumavkách v horkovzdušném sterilizátoru jednu hodinu při 80 °C. Tento postup se druhý den opakuje, aby byly zničeny možné kontaminující mikroorganismy, které první sterilizaci přežili například ve formě spor. Zkumavky s připravenou pevnou fází média jsou skladovány v lednici. Tekutá složka média sestává z 500 ml Ringerova roztoku a 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku.

Tab. 1: Složení Ringerova roztoku:

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

Oba roztoky jsou připravovány a autoklávovány odděleně, aby se předešlo vysrážení fosfátů v přítomnosti vápenatých kationtů. Poté co roztoky zchladnou, se oba smíchají dohromady a přidá se 50 ml pipetou sterilně odebraného vaječného bílku (přibližně ze dvou vajec). Tekutá složka je pak uchovávána v lahvi v lednici. Před použitím média se do zkumavky k pevné složce přidají cca 3 ml tekuté složky.

2.3. Izolace prvoků

Prvoci byli izolováni ze střev termitích dělnic a larev zlatohlávků. Hmyz byl nejprve usmrcen octanem ethylatým. Poté následovala samotná pitva, při které byl odebrán obsah střev zkoumaného jedince. V této střevní tekutině byli obsaženi hledaní prvoci. Vzorek byl ihned analyzován pomocí světelného mikroskopu, aby se potvrdila přítomnost prvoků. Tento materiál byl nadále využit k izolaci DNA, nebo ke kultivaci.

2.4. Kultivace střevních bičíkovců

Pro kultivaci prvoků v agnotobiotických polyxenických kulturách za teploty 26 °C bylo používáno médium Dobell-Leidlaw. Kmeny udržované v kultuře byly ve sterilním boxu pomocí sterilních Pasteurových pipet přeočkovány jednou za 7 dní.

2.5. Barvení prvoků a optická mikroskopie

Barvení podle Giemsa-Romanowski

Použité chemikálie a roztoky:

- Giemsa stain
- methanol
- směs čistého ethanolu s éterem (1:1)

Metoda podle Giemsa-Romanowski se u prvoků využívá k obarvení jádra, cytoplasmy, bičíků, rhizoplastu a povrchových záhybů. Tuto metodu lze s úspěchem použít při rodovém určení prvoků.

Podložní sklíčka byla nejprve odmaštěna pomocí ethanol-éteru. Na tato sklíčka byl následně z kapky kultury nebo čerstvě izolovaného střevního obsahu proveden suchý roztěr. Po zaschnutí byl roztěr fixován methanolem po dobu asi 5 minut. Poté byl preparát osušen a barven 15 až 40 minut roztokem Giemsy naředěným destilovanou vodou v poměru 1:20. Pak bylo sklíčko opláchnuto v mírném proudu vody a nechalo se oschnout. Preparáty byly skladovány v temnu v uzavřené krabici.

Barvení DAPI

Použité chemikálie a roztoky:

- methanol
- aceton
- DAPI
- směs čistého ethanolu s éterem (1:1)

Tato metoda se využívá k obarvení struktur, které obsahují DNA. U zkoumaných prvoků tak bylo dobře obarveno jádro a případně také symbiotické bakterie.

Na podložní sklíčka, která byla nejprve odmaštěna, byl proveden roztěr vzorku odebraného přímo ze střeva hmyzu nebo z kultury. Roztěr se nechal zpola zaschnout. Následovala fixace methanolem při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut a po ní fixace acetonem trvající 8 minut za téže teploty. Poté byl vzorek zakápnut barvivem DAPI. Následně bylo provedeno pozorování pod mikroskopem.

Zpracování preparátů a pozorování živých bičíkovců

Použité chemikálie a roztoky:

- Xylen
- směs éteru s čistým ethanolem (1:1)

Použité programy:

- Viewfinder Lite (verze 1.0)
- Studio Lite (verze 1.0)
- Corel PHOTO-PAINT

Preparáty byly pozorovány mikroskopem Olympus BX51 při různém zvětšení (100x až 1000x) a vyfoceny digitální kamerou . Pořízené digitální fotografie byly upraveny na požadovaný formát v programu Corel PHOTO-PAINT. Živí prvoci byli pozorováni mikroskopem při zvětšení 40x – 400x za použití fázového kontrastu a někteří vyfotografováni digitálním fotoaparátem.

2.6. Izolace DNA

Použité chemikálie a roztoky:

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

Před izolací DNA z polyxenických kultur či střevního obsahu byli prvoci centrifugováni 10 min při 1000 g, aby se zvýšila jejich koncentrace (a tím i koncentrace DNA). DNA z polyxenických kultur byla izolována kitem "High pure PCR template preparation kit" (Roche), podle protokolu 3.3.1.: "Isolation of nucleic acids from whole blood, buffy coat, or cultured cells". DNA byla dlouhodobě uchovávána v -20 °C.

2.7. Elektroforéza

Použité chemikálie a roztoky:

- TBE pufr
- agaróza
- ethidiumbromid (zásobní roztok 10 mg.ml⁻¹)
- nanášecí pufr, 6x konc. (0,25% bromfenolová modř, 0,25% xylylencyanol, 30% glycerol)

Kvalita získané DNA a výsledky PCR (nebo přečištění PCR produktu) byly ověřeny na horizontální elektroforéze v TBE pufru na 1% agarózovém gelu o délce 8 cm při gradientu napětí 10 V. cm⁻¹. DNA byla zviditelněna ethidiumbromidem pod UV světlem. Ethidiumbromid byl do gelu přidán při přípravě gelu ve finální koncentraci asi 350 ng na ml gelu. Gel byl vyfocen videokamerou a vytištěn na printeru.

2.8. Amplifikace SSU rDNA

Použité chemikálie a roztoky:

- Taq DNA polymeráza (1U.□l⁻¹)
- PCR pufr bez MgCl₂, 10x konc.
- MgCl₂ (25 mM)
- dNTP mix (2 mM každý)
- sterilní miliQ H₂O
- primery, jejich názvy a sekvence viz tab. 5
- vzorky DNA

Amplifikován a následně sekvenován byl gen pro 18S rRNA (SSU rDNA), který má u studovaných prvoků délku asi 1800 nukleotidů. Gen pro SSU rDNA byl nejprve amplifikován primery specifickými pro eukaryota nebo primery specifickými přímo pro zkoumané prvoky. PCR produkt byl přečištěn a poté buď zaklonován a jednotlivé klony pak byly vyšetřeny a sekvenovány, nebo byl sekvenován přímo.

Tab.2. Složení reakční směsi pro amplifikaci SSU:

Sterilní miliQ H ₂ O	doplnit do 50 µl
PCR pufr	5 µl
MgCl ₂	3,75 µl
dNTP mix	2,5 µl
Taq polymeráza	2,5 µl
Primer 1	12,5 pmol
Primer 2	12,5 pmol
DNA	až 5 ng

Tab. 3: Primery používané při amplifikaci

Název	Orientace	Sekvence 5' → 3'	Annealingová t.
MedlinA	F (Forward)	CGT GTT GAT CTT GCC AG	50 °C
MedlinB	R (Reverse)	TGA TCC TTC TGC AGG TCC ACC TAC	50 °C
Oxy F1	F	GCA GGC GCG CAA ATT AC	50 °C
Oxy F2	F	AGG GCA AGT CTG GTG CCA	50 °C
Oxy R1	R	ACR ¹ GAC CTG TTA TTG CCT CA	50 °C
Oxy R2	R	GAG GTC TCG TTC GTT ATC GS ² A	50 °C

Primery Medlin jsou specifické pro SSU rDNA eukaryot (Medlin *et al.* 1988), vzhledem k ostatním primerům použitým v mé práci jsou vždy vnější. Primery série Oxy byly navrženy podle známých sekvencí SSU rDNA Oxymonád. Primery byly použity ve dvojicích v různých kombinacích.

Tab. 4: Nastavení teplotního cyklu v termocykleru pro amplifikaci SSU

Počet opakování	Teplota	Čas
1x	94 °C	4min
31x	94 °C	1 min
	Annealingová teplota	1 min
	72 °C	2 min
1x	72 °C	10 min

PCR reakce byla prováděna v termocykleru při nastavení kalkulované kontrolní metody a s použitím vyhřívaného víka. Přítomnost, počet a délka PCR produktů byla po proběhnutí reakce ověřena pomocí elektroforézy.

2.9. Příprava vzorků na klonování, přímou sekvenací

Použité chemikálie a roztoky:

- QIAquick[®] PCR Purification Kit, Qiagen GmbH
- QIAquick[®] Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH
- MiliQ H₂O

¹ R = A nebo G

² S = G nebo C

V případech, kdy se naamplifikoval pouze jediný fragment DNA, byl PCR produkt přečištěn od primerů kitem QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) podle protokolu "QIAquick PCR Purification Protocol using a microcentrifuge". DNA byla eluována do 25 µl vody. Jestliže naamplifikovaných fragmentů DNA bylo více, byla část elektroforetického gelu s žádaným fragmentem vyříznuta sterilním skalpelem a fragment byl přečištěn od agarózy pomocí kitu QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen) podle protokolu "QIAquick Gel Extraction Protocol using a microcentrifuge". DNA byla opět eluována do 25 µl vody. Čistota fragmentu byla zkontrolována pomocí elektroforézy. Koncentrace DNA ve vzorku byla odhadnuta podle koncentračního standardu.

2.10. Klonování a izolace plasmidu

Použité chemikálie a roztoky:

- pGEM[®]-T Easy vector system I (A1360), Promega Co.
- Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega Co.
- médium LB Broth
- ampicilin (zásobní roztok 10 mg.ml⁻¹)
- X-gal (zásobní roztok 50 mg.ml⁻¹)
- IPTG

Přečištěné naamplifikované fragmenty byly klonovány pomocí kitu pGEM-T Easy vector cloning kit (Promega). Tento kit je založen na selekci modifikovaných bakterií pomocí rezistence k ampicilinu a na bílo-modré selekci bakterií s inzertem. Klonování bylo prováděno podle příslušných protokolů.

Modifikované bakterie byly poté vysety na Petriho misku s agarovým LB médiem (1,5 g agaru na 100 ml rozpuštěného LB), ampicilinem (100 µg.ml⁻¹), X-gal (na Petriho misku natřeme 20µl ze zásobního roztoku 50 mg.ml⁻¹) a IPTG (na Petriho misku natřeme 100 µl 0,1 M roztoku). Misky s bakteriemi byly inkubovány přes noc ve 37 °C, druhý den byly vybrány bílé kolonie a jedna modrá kolonie, která sloužila jako negativní kontrola. Bakterie z vybraných kolonií byly naočkovány do zkumavky Falcon s 3 ml média LB bez agaru s ampicilinem (100 µg. µl⁻¹) a inkubovány přes noc na třepačce (225 rpm, 37 °C).

K izolaci plasmidu používán kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Plasmid byl izolován podle protokolu "Plasmid DNA Isolation and Purification Protocol (Centrifugation Protocol)". S izolovanými plasmidy byla provedena elektroforéza.

2.11. Sekvenační reakce, přečištění produktu a vlastní sekvenace

Použité chemikálie a roztoky:

- ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit, Applied Biosystems
- sterilní miliQ H₂O
- ethanol (70%, 96%)
- octan sodný (NaAc, 3M)

Tab. 5: Primery použité pro sekvenaci.

Název primeru	Sekvence 5' → 3'
Blast1195F	GGA AGG GCA CCA CCA G
Blast430R	TY ³ C GCG CCT GCT GCC T
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13R	AAC AGC TAT GAC CAT G
Mon300F	TAA TTC TAG AGC TAA TAC
Mon400F	GTT TTG ACG GGT AAC G
Mon1100F	GAA GAA AAT GGA GTG TT
Mon1300R	TAA TGT GR ⁴ T CAG TAG CGA
Mon1600R	TCT TGA TTA ATG AAA AC
OxyF1	GCA GGC GCG CAA ATT AC
Sp6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TA
295F	GCG GTT ACC GTC GGA CT
577F	GCC AGC AGC CGC GGT
1055R	CGG CCA TGC ACC ACC
1510R	GGG CAT CAC AGA CCT G

Sekvenační reakce byla provedena s přečištěným fragmentem nebo izolovaným plasmidem. Primery M13F, M13R, Sp6 a T7 jsou plazmidové primery a proto byly používány pouze při sekvenování fragmentu zaklonovaného v plazmidu. K sekvenační reakci byl použit kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction Kit (Applied Biosystems). Oproti původnímu protokolu byla z finančních důvodů použita čtvrtinová koncentrace Terminator Ready reaction Mix. I tato "čtvrtinová reakce" se pro sekvenaci osvědčila.

³ Y = C nebo T/U

⁴ R = A nebo G

Tab. 6: Složení reakční směsi pro čtvrtinovou sekvenační reakci.

Terminator Ready reaction Mix	2 μl
sekvenační pufr	4 μ l
primer	3,2 pmol
DNA	10 – 40 ng
H ₂ O	doplnit do 20 μ l

Sekvenační reakce probíhala v termocykleru při nastavení kalkulované kontrolní metody a s použitím vyhřívaného víka.

Tab. 7: Nastavení teplotní cyklu v termocykleru pro sekvenační reakci

Počet opakování	teplota	Čas
25x	96 °C	10 s
	50 °C	5 s
	60 °C	4 min

Následná příprava pro analýzu na automatickém sekvenátoru zahrnuje přesrážení DNA ethanolem s octanem sodným, čímž je zbavena dideoxynukleotidů. K sekvenační reakci (20 μ l) přidáme 50 μ l 96% ethanolu a 2 μ l 3M NaAc a mikrozkuhavku necháme stát v pokojové teplotě 15 minut, aby precipitovala DNA. Centrifugujeme 15 minut při 12000 rpm. Opatrně odebereme supernatant. Přidáme 250 μ l 70% ethanolu opět centrifugujeme při stejných otáčkách 5 minut. Opatrně odebereme supernatant a pelet usušíme. Resuspendujeme pelet ve 25 μ l Template Suppression reagent, vzorky protřepeme a centrifugujeme. Zahřejeme na dvě minuty na 95 °C, poté zchladíme na ledu. Vzorky protřepeme a centrifugujeme. Poté byly vzorky odevzdány k osekvenování v sekvenační laboratoři PřF UK.

2.12. Vyhodnocování sekvencí

Použité programy:

- Seqman (v. 3.61)
- BioEdit (v. 5.0.9.)

Výstupy sekvenačních reakcí ve formě křivek fluorescence byly pomocí programů Seqman a BioEdit převedeny na výslednou sekvenci. Sekvence byla uložena ve formátu FASTA. Do sekvence genu nebyly zahrnuty úseky primerů.

2.13. Fylogenetické analýzy

Příprava alignmentu

Použité programy:

- ClustalX (verze 1.81)
- BioEdit (v. 5.0.9.)

Sekvence ve formátu FASTA byly vloženy do programu ClustalX, pomocí kterého byl proveden alignment. Hotový alignment byl převeden do programu BioEdit, kde byl dále upraven. Z alignmentu byly vyjmuty hypervariabilní oblasti, kde nebylo jisté, zda byl alignment proveden správně. Začátek a konec alignmentu byly zkráceny tak, aby všechny sekvence začínaly a končily ve stejné pozici. Alignment byl exportován ve formátu Nexus.

Tvorba fylogenetických stromů a bootstrapping

Použité programy:

- PAUP (v. 4.0)
- Modeltest (v. 3.06)
- MrBayes (v. 3.0.)

Pro tvorbu fylogenetických stromů byla využita metoda nejmenších čtverců „Fitch-Margoliash“ s log det vzdálenostmi (Log Det), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) a bayesovská metoda (což je v podstatě modifikace metody maximum likelihood). K vyhledávání stromů pomocí metod Log Det, MP a ML byl použit program PAUP 4.0. K určení topologie stromů pomocí metody Bayes byl použit program MrBayes 3.0.

Při vyhledávání stromů byla využita heuristická metoda. Bylo prověřeno vždy 10 replikátů v nichž byl výchozí strom zkonstruován za přidávání taxonů v náhodném pořadí. Spolehlivost výsledné topologie byla u všech metod statisticky ohodnocena pomocí metody bootstrapování.

3. Výsledky a diskuse:

3.1. Vyšetření hostitelé a kultivace

Na přítomnost střevních prvoků byly vyšetřeny tři druhy termitů, devět druhů zlatohlávků, jim blízký příbuzný *Propomacrus*, dále roháč *Lucanus maculifemoratus* a tesařík *Rhagium inquisitor*. Z termitů šlo konkrétně o druhy *Neotermes castaneus*, *Neotermes cubanus* a o neurčený druh termita, pravděpodobně z rodu *Procryptotermes* ze Sokotry. U všech třech druhů termitů byla zjištěna přítomnost velkého množství střevních bičíkovců, nejnápadnější byli prvoci ze skupiny Hypermastigida. Seznam konkrétních prvoků ukazuje tabulka 8.

Tab. 8: Vyšetřené druhy termitů a zjištění prvoci

Termit	Zjištění prvoci
<i>Neotermes castaneus</i>	Oxymonadida (<i>Monocercomonoides</i>), Parabasala - Calonymphidae, Devescovicidae, Trichonymphida
<i>Neotermes cubanus</i>	Oxymonadida (<i>Monocercomonoides</i>), Parabasala - Trichonymphida (<i>Staurojoenina</i>), Trichomonadidae (<i>Trichokovina</i>), Devescovicidae (<i>Foaina</i>)
<i>Procryptotermes</i> sp.	Oxymonády, Parabasala - Calonymphidae, Devescovicidae, Trichomonadidae, Trichonymphida

Vyšetřených druhů brouků, zvláště larev zlatohlávků, bylo více. Jejich přehled spolu se seznamem prvoků v nich nalezených shrnuje následující tabulka.

Tab. 9: Vyšetřené druhy brouků a zjištění prvoci

Brouk	Zjištění prvoci
<i>Cetonischema aeruginosa</i>	Oxymonády (<i>Monocercomonoides</i>)
<i>Eudicella euthalia</i>	Oxymonády (<i>Monocercomonoides</i>), Gregariny, Nálevníci
<i>Goliathus orientalis</i>	Oxymonády, Trichomonády, Diplomonády (<i>Dimitus?</i>)
<i>Lucanus maculifemoratus</i> ⁵	Oxymonády (<i>Monocercomonoides</i>), Trichomonády, Retortamonády, Diplomonády, Nálevníci (<i>Nyctoterus</i>)
<i>Mecinorrhina ugadensis</i>	Oxymonády, Diplomonády
<i>Netocia afflicta</i>	Nálevníci (<i>Nyctotherus</i>)
<i>Pachnoda thoracica</i>	Oxymonády, Retortamonády, Diplomonády (<i>Trepomonas</i> , <i>Hexamita</i>)
<i>Potosia affinis</i>	Oxymonády
<i>Potosia cuprina</i>	Oxymonadida (<i>Monocercomonoides</i>)
<i>Propomacrus bimucronatus</i> ⁶	Oxymonády (<i>Monocercomonoides?</i>)
<i>Rhagium inquisitor</i> ⁷	_____
<i>Stephanorrhina guttata</i>	Oxymonády, Nálevníci

⁵ Patří do čeledi Lucanidae

⁶ V tomto případě se nejedná o zlatohlávka, ale o příslušníka příbuzné skupiny Euchiridnae

⁷ Rod *Rhagium* patří do čeledi Cerambycidae (tesaříkovití)

Z předcházejících tabulek je zřejmé, oxymonády se vyskytovaly téměř u všech vyšetřovaných jedinců hmyzu a zdají se tak být běžnou součástí střevní fauny hmyzu. Oproti tomu parabasalidé byli zaznamenáni jen u termitů a u zlatohlávka *Potosia cuprina*. To vypovídá o jejich zvláštních životních nárocích, které se zdají být značně specifické (narozdíl od oxymonád). Přítomnost parabasalidů byla prokázána až na výjimky (*Potosia cuprina*) jen u hmyzu s přísnou xylofagií, tj. termitů, kde spolu se symbiotickými bakteriemi tvoří důležitou součást střevního společenstva a svému hostiteli pomáhají štěpit celulózu. Z toho lze usuzovat, že ekologické nároky parabasalidů (zvláště hypermastigidů) jsou výrazně specifičtější než u oxymonád a jejich vztah k jejich hostitelům je užší. Z ostatních skupin prvoků byly vcelku hojně zastoupeny diplomonády, trichomonády, retortamonády a také nálevníci, představovaní rodem *Nyctotherus*. Zajímavá je všeobecně malá početnost gregarin (nalezeny pouze u *Eudicella euthalia*) a úplná absence jakýchkoli prvoků ve střevě larvy *Rhagium inquisitor*.

Prvoci ze střev veškerého hmyzu byli odebráni do média Dobell-Leidlaw. V kulturách se ale, vzhledem k vysokým životním nárokům daných prvoků, podařilo zachytit pouze některé (viz tabulka). U prvoků ze střev termitů byl pravděpodobně limitujícím faktorem nedostatek vhodné potravy v médiu a nepřítomnost symbiotických bakterií, se kterými mají tyto prvoci velmi úzké vazby. Důvod, proč se některé prvoky ze střev brouků do kultur podařilo zachytit a jiné nikoli, se nepodařilo zjistit. Prvoci, které se podařilo zachytit do kultury úspěšně přežívají již po mnoho pasáží a kultury se zdají být stabilní. Laskavostí Tomáše Pánka a Víta Smoly se mi podařilo získat ještě média s prvoky pocházejících ze švábů *Blaberus atrops* a *Byrsothria fumigata*.

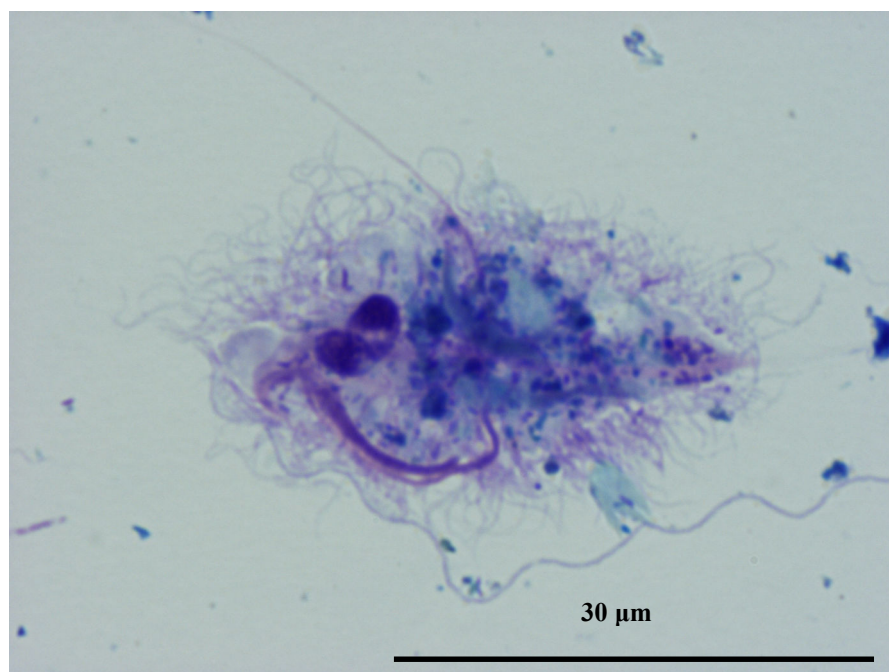
Tab.10: seznam kultur a hostitelů, z nichž pocházejí

Hostitel	Název kultury
<i>Cetonischema aeruginosa</i>	CeAe
<i>Mecinorrhina ugadensis</i>	MecUg
<i>Potosia cuprina</i>	PC
<i>Pachnoda thoracica</i>	PF
<i>Blaberus atrops</i>	BlAtr
<i>Byrsothria fumigata</i>	BFum

3.2. Optická mikroskopie

Optickým mikroskopem byly pozorovány všechny odebrané vzorky. Fotografie byly pořízeny ze vzorků pocházejících ze všech tří druhů termitů a z *Potosia cuprina*.

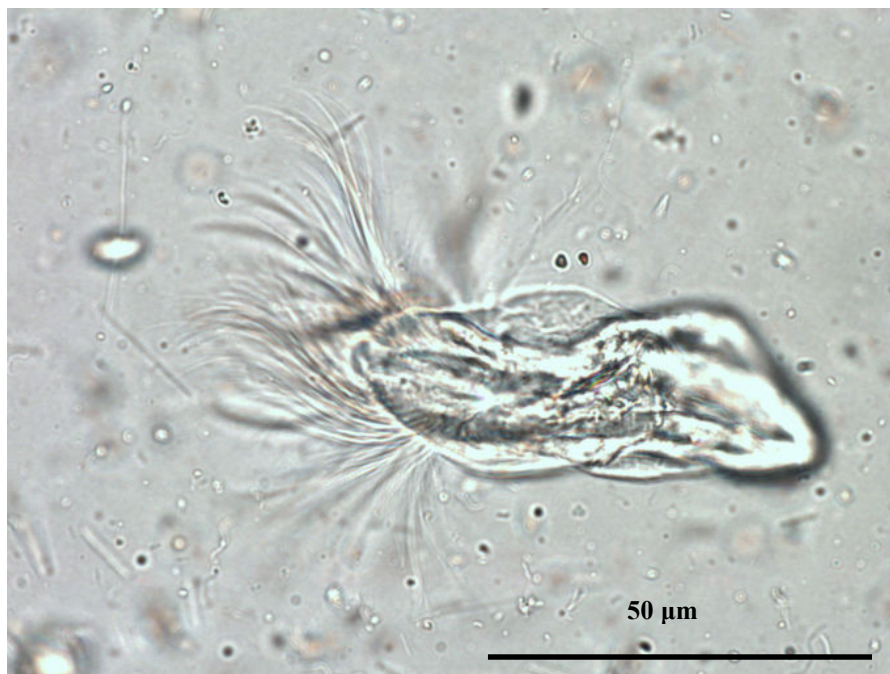
Prvoci, kteří byli získáni z termita *Neotermes cubanus* (obr. 12-13) a zlatohlávka *Potosia cuprina* (obr. 22-24) byli vyfotografováni pouze po obarvení Giemsou. Prvoci z termita rodu *Procryptotermes* ze Sokotry (obr. 14-21) byli navíc vyfotografováni v nativním preparátu v normálním světle a poté za použití fázového kontrastu a Nomarského kontrastu. Pro obarvení prvoků z termita *Neotermes castaneus* bylo použito barvivo DAPI, po obarvení byli prvoci vyfotografováni (obr. 25-27).



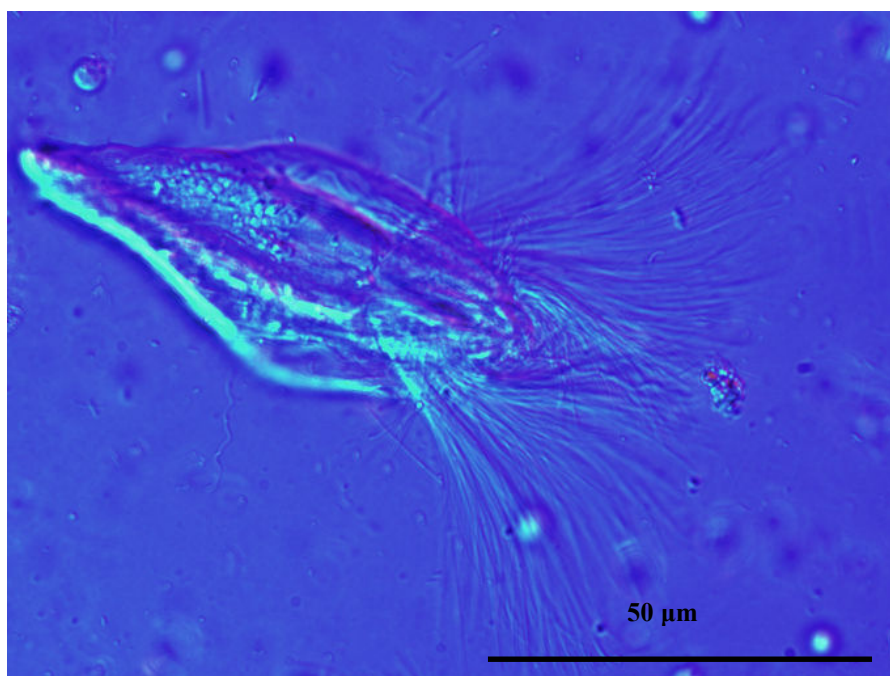
obr. 12:
Foaina sp. ze střeva
Neotermes cubanus s dobře
 patrnými symbiotickými
 bakteriemi, barveno Giemsou



obr. 13:
Trichokovina hrdyi ze střeva
Neotermes cubanus Dobře je
 patrný axostyl a undulující
 membrána, barveno Giemsou



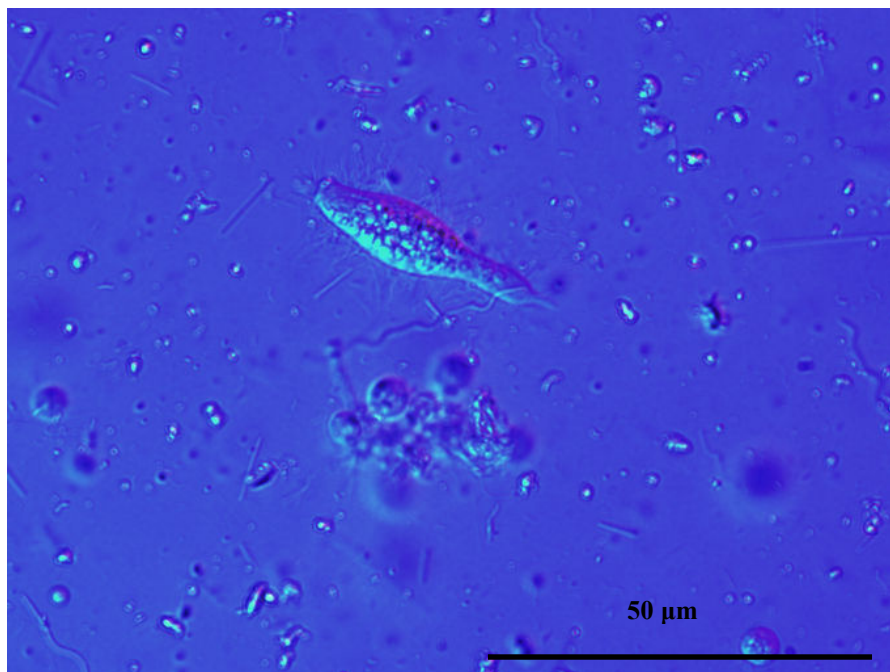
obr. 14:
Trichonymphida gen. sp. ze
střeva *Procryptotermes* sp.,
použit fázový kontrast



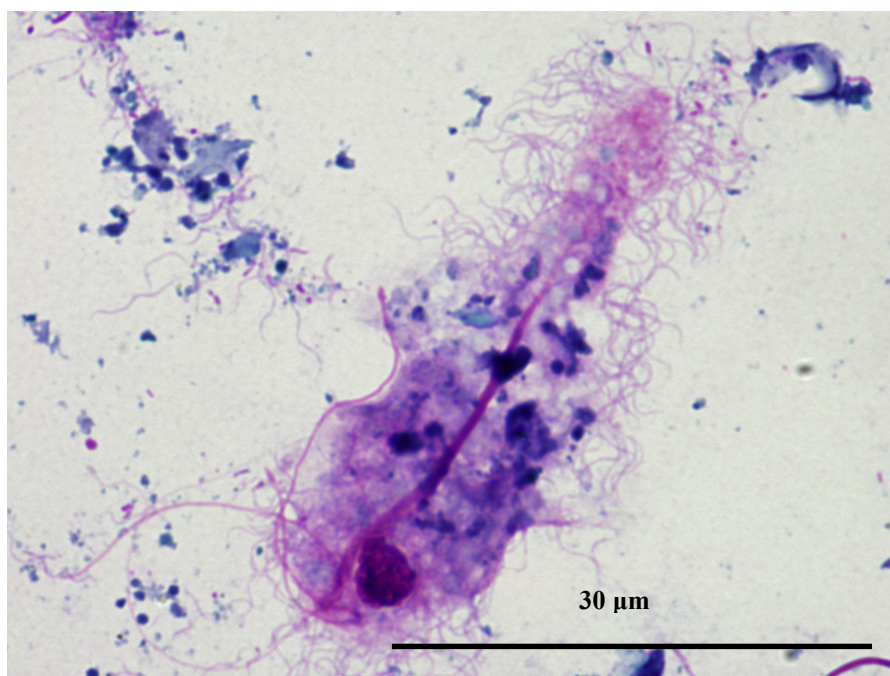
obr. 15:
Trichonymphida gen. sp. ze
střeva *Procryptotermes* sp.,
použit Nomarského kontrast



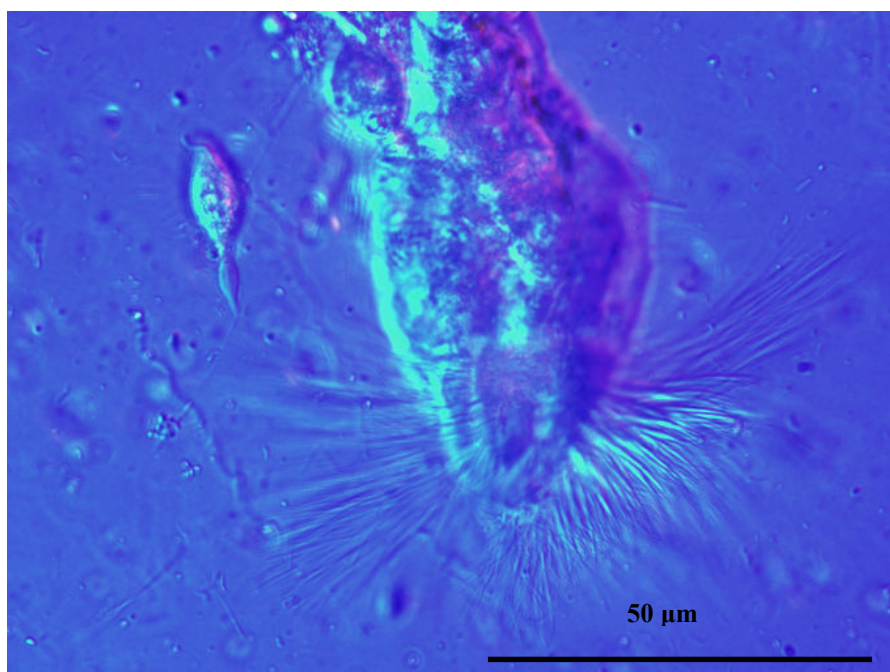
obr. 16:
Devescoviinidae gen. sp. ze
střeva *Procryptotermes* sp.
s dobře patrným axostylem
použit fázový kontrast



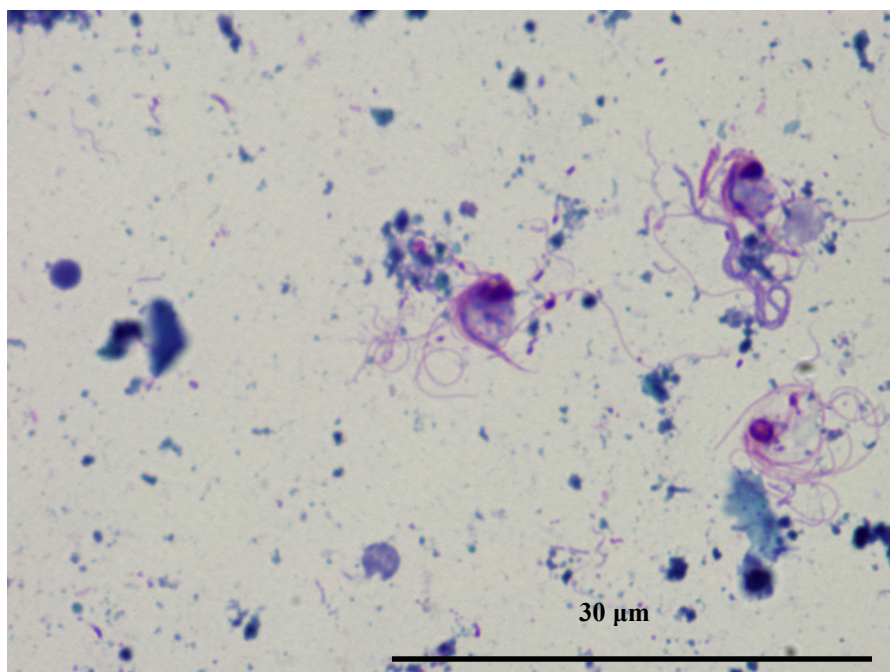
obr. 17:
Devescovinidae gen. sp. ze
střeva *Procryptotermes* sp.,
použit Nomarského kontrast



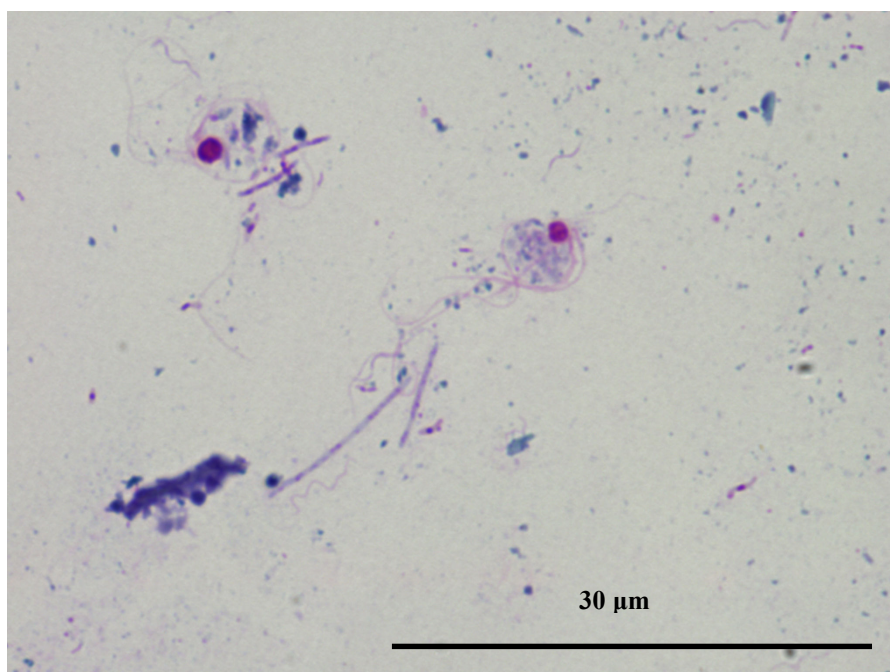
obr. 18:
Devescovinidae gen. sp. ze
střeva *Procryptotermes* sp. s
dobře patrnými symbiotickými
bakteriemi, barveno Giemsou



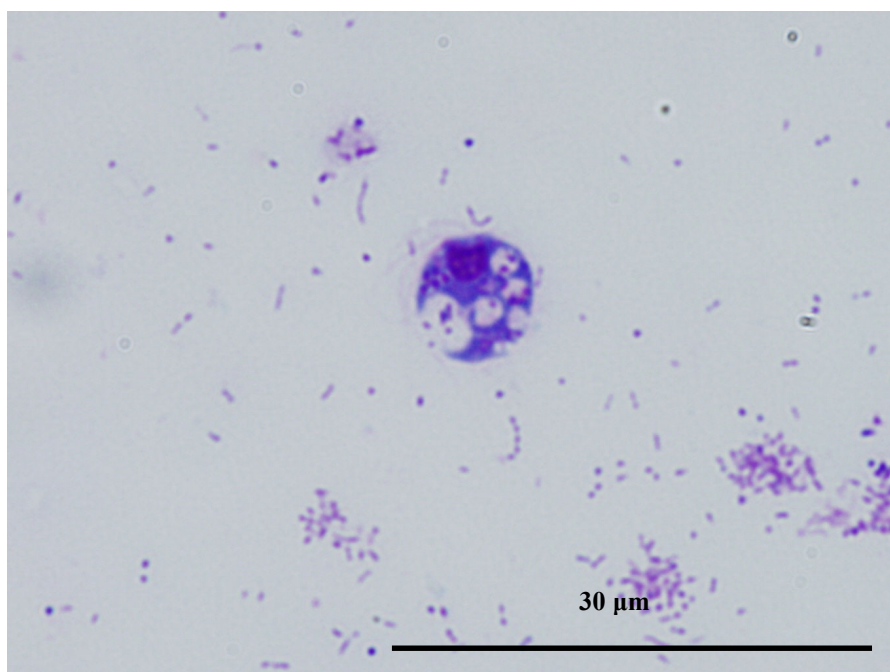
obr. 19:
srovnání velikostí
Devescovinidae gen. sp. a
Trichonymphida gen. sp. ze
střeva *Procryptotermes* sp.,
použit Nomarského kontrast



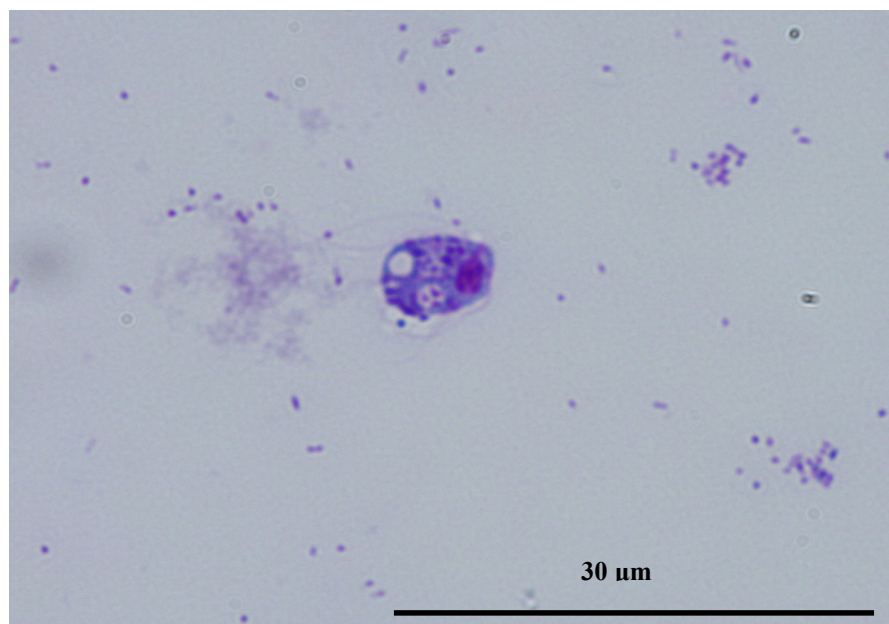
obr. 20:
 Monocercomonadidae gen. sp.
 ze střeva *Procryptotermes* sp.,
 barveno Giemsou



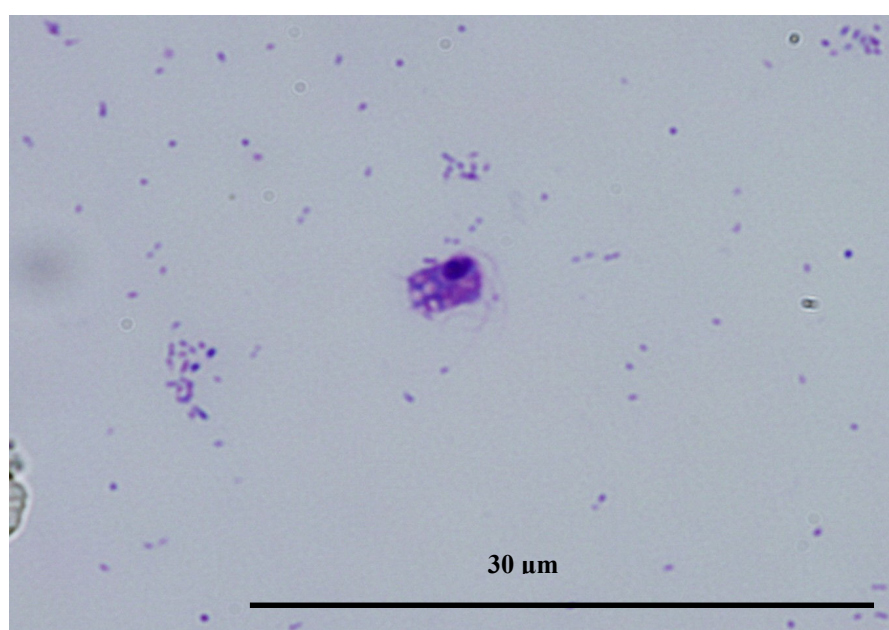
obr. 21:
 Monocercomonadidae gen. sp.
 ze střeva *Procryptotermes* sp.,
 barveno Giemsou



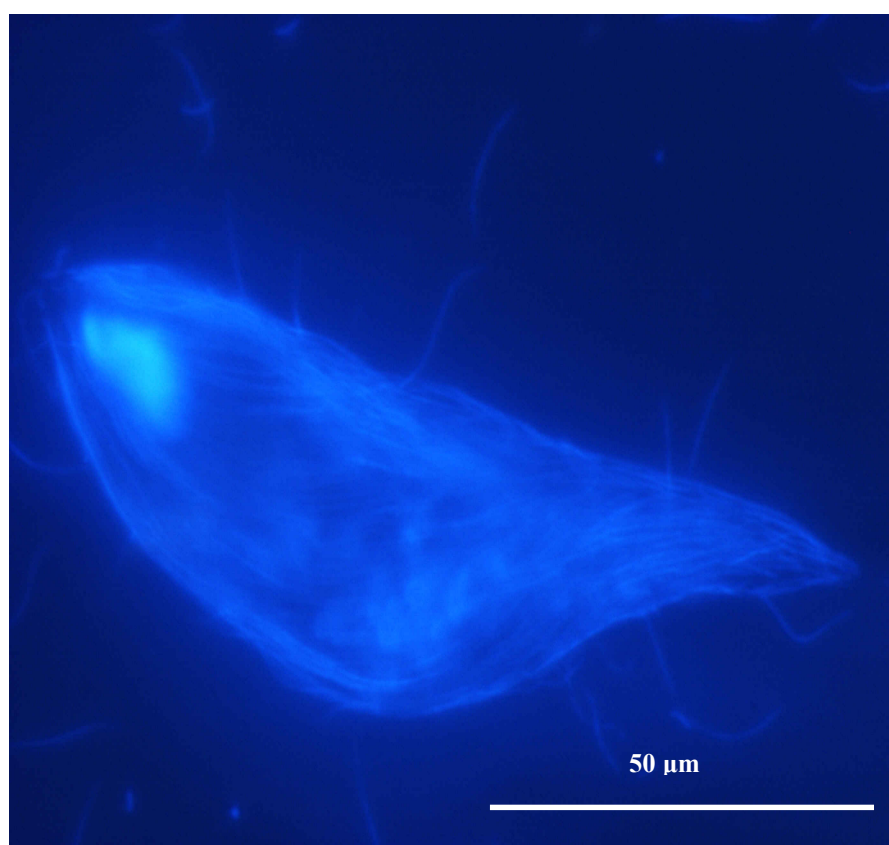
obr. 22:
Monocercomonoides sp z
 kultury PC (*Potosia cuprina*),
 barveno Giemsou



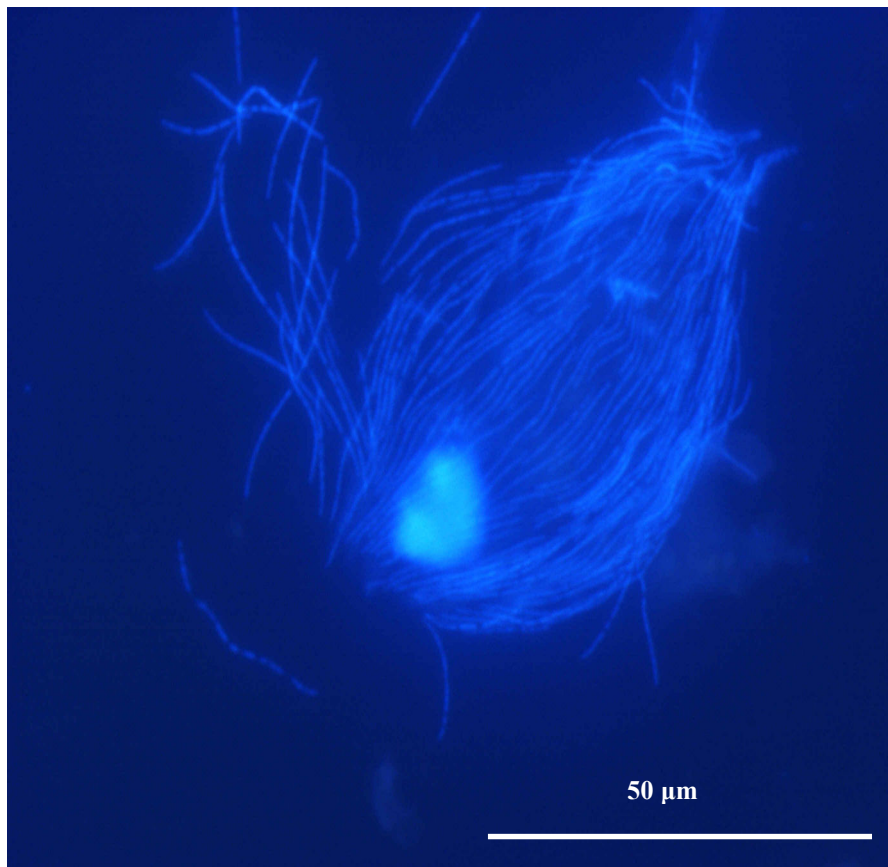
obr. 23:
Monocercomonoides sp z
 kultury PC (*Potosia cuprina*),
 barveno Giemsou



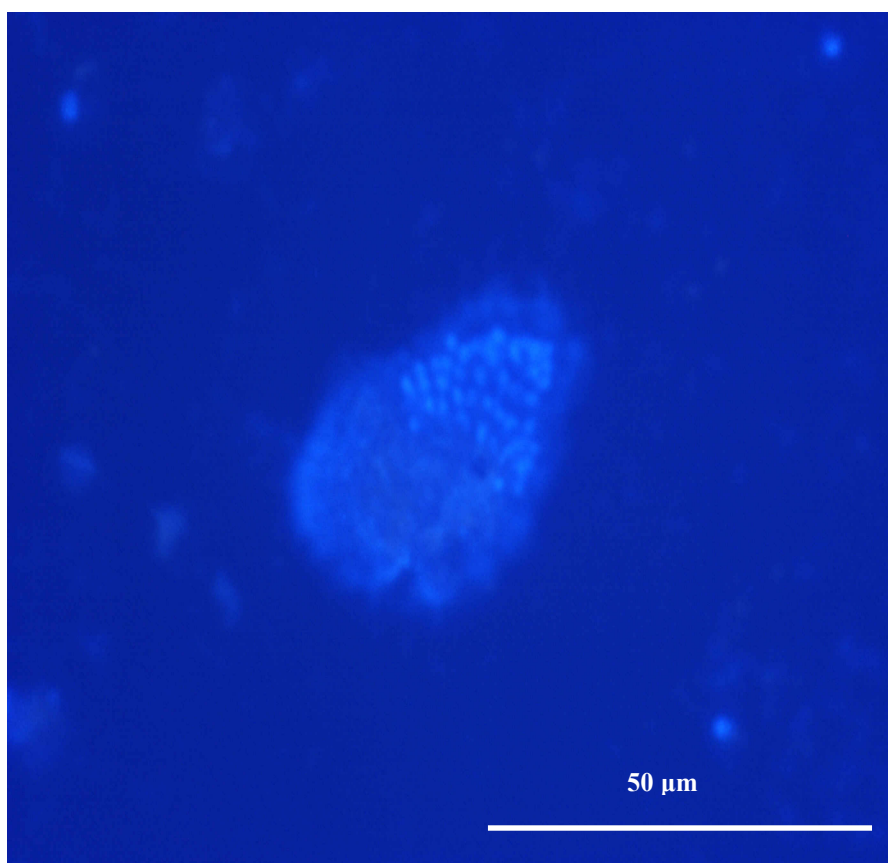
obr. 24:
Monocercomonoides sp z
 kultury PC (*Potosia cuprina*),
 barveno Giemsou



obr. 25:
 Trichonymphidae gen. sp. ze
 střeva *Neotermes castaneus*,
 barveno DAPI



obr. 26:
Trichonymphidae gen. sp. ze
střeva *Neotermes castaneus* s
dobře patrnými symbiotickými
bakteriemi, barveno DAPI



obr. 26:
Calonyphidae gen. sp. ze
střeva *Neotermes castaneus*,
dobře je patrné velké množství
jader, barveno DAPI

Ačkoli jsem se ve své práci morfologií prvoků přímo nezabýval, bylo zajímavé si ověřit jaké metody focení a barvení jsou pro dané prvoky vhodné.

Focení nativních preparátů se osvědčilo u všech pozorovaných prvoků. U velkých prvoků (např. rod *Calonympha*), kteří hynuli jako první, bylo nutné přistoupit k focení co nejdříve po zhotovení preparátu. Menší, rychle se pohybující prvoky bylo naopak nutné zpomalit přidáním chemikálií, například formaldehydu. Barvení Giemsou, fázový kontrast a Nomarského kontrast se osvědčily při fotografování všech prvoků. Barvení DAPI se osvědčilo nejvíce u velkých prvoků, zvláště různých hypermastigidů, s povrchem pokrytým množstvím symbiotických bakterií, které byly spolu s jádrem samotného prvoka obarveny barvivem DAPI.

3.3. Sekvence SSU rDNA

Kompletní sekvence SSU rDNA byly získány z prvoka rodu *Monocercomonoides* pocházejícího z termity *Neotermes cubanus*. Tato sekvence byla nazvána NeoC. Druhá kompletní sekvence, nazvaná PotCupri, byla získána z dosud nepopsaného parabasalida ze zlatohlávka *Potosia cuprina*.

Sekvence *Monocercomonoides*, izolovaného přímo ze střeva termity *Neotermes cubanus* byla získána osekvenováním PCR produktu získaného amplifikací pomocí primerů specifických pro Eukaryota (MedlinA a MedlinB), následně zaklonovaného do plazmidu. Sekvence parabasalida izolovaného z kultury PC ze zlatohlávka *Potosia cuprina* byla také získána osekvenováním PCR produktu získaného amplifikací pomocí primerů MedlinA a MedlinB, následně zaklonovaného do plazmidu. Amplifikací byly ale získány dva PCR produkty. Zaklonováním PCR produktů byly získány jejich klony. Porovnání jejich částečných sekvencí s internetovou databází neodhalilo, že by se jednalo o rozdílné organismy, mimo jiné proto, že tato databáze dosud neobsahuje blíže příbuznou sekvenci. Podrobné porovnávání obou úplných sekvencí ale odhalilo, že se od sebe navzájem mírně liší. Tato odlišnost nebyla příliš velká, jen na třech místech o délce 20 až 50 bazí se od sebe sekvence nápadně odlišovaly. Z těchto faktů je patrné, že se pravděpodobně jedná o dva blízce příbuzné druhy téhož rodu. Jedno ze zmíněných variabilních míst ukazuje následující obrázek.

obr. 27: srovnání variabilní části sekvencí SSU rDNA PotCupri

```

ATGATGTGTTTTTCCCACGCGCCTTC-----GGGGGCGTGAGAAAAGCGCGAC Potcupri pd
ATGATGTGTTTTTCTTTTCTTTCTTCAGCAATGGGGAGAGGGAAAAGAAAAGCGCGAC Potcupri pk
*****          *      **          *   ***          *****

```

Mimo tří výše uvedených kompletních sekvencí byly získány i částečné sekvence SSU rDNA z kultur BlAtr a BFum. Tyto sekvence zatím čekají na další zpracování. Průběh získání sekvencí se lišil od obou předcházejících případů. PCR produkt získaný amplifikací pomocí primerů specifických pro oxymonády (OxyF1 a OxyR1) nebyl zaklonován, ale byl přečištěn a následně s ním byla rovnou provedena sekvenační reakce.

3.4. Fylogenetické analýzy

Pro konstrukce stromů byly ve fylogenetických analýzách použity sekvence SSU rDNA různých druhů prvoků, které byly získány z internetové databáze GenBank a od Vladimíra Hampla. S těmito sekvencemi a se sekvencemi které byly získány během mé práce byly provedeny fylogenetické analýzy za použití metody nejmenších čtverců „Fitch-Margoliash“ s log det distancemi (Log Det), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) a bayesovské metody. Před provedením analýz byl vždy připraven alignment, který byl poté upraven za pomoci programu Bioedit. Úprava spočívala v odstranění variabilních úseků, kde nebylo jisté, zda jsou sekvence správně alignovány, sekvence byly potom na obou koncích „ořezány“ tak, aby všechny začínaly a končily ve stejné pozici.

Výsledkem fylogenetických analýz, provedených se sekvencí SSU rDNA prvoka z termita *Neotermes cubanus*, je fylogenetický strom na obrázku 28. Všechny metody pro rekonstrukci fylogenetických vztahů umísťovaly tohoto prvoka do rodu *Monocercomonoides*. Jeho pozice v rámci tohoto rodu byla podpořena bootstrapy 77/*/66 (ML/MP/LogDet). Nižší hodnota bootstrapů však může být v tomto případě způsobena spíše vlivem jiných izolátů, jmenovitě TENE79. Po odstranění této sekvence se bootstrapová podpora pro rod *Monocercomonoides* zvýší (79 pro MP). Nicméně vzájemná příbuznost v rámci celého rodu je vzhledem k malé podpoře značně nejistá. Přesto z těchto údajů vyplývá, že se s vysokou pravděpodobností jedná o prvoka rodu *Monocercomonoides*. Jde také o druh, jehož sekvence SSU rDNA zatím nebyla popsána, ačkoli nelze vyloučit, že tento druh již byl v minulosti popsán na základě své morfologie. Podrobná morfologická analýza, která by mohla potvrdit příslušnost ke konkrétnímu druhu, se však, vzhledem ke své časové náročnosti, teprve chystá. Další rody (*Saccinobaculus* atd.), popřípadě skupiny rodů (*Pyrsonympha* a *Dinenympha*) byly ve fylogenetické analýze rekonstruovány s vysokou podporou, což ukazuje na relativní spolehlivost celkové rekonstrukce fylogenetických vztahů. Sekvence monocercomonoidů TENE79, BOA, LEI, OEV, CYRT byly získány od již výše zmíněného Vladimíra Hampla a doposud nebyly publikovány. Hostitelé jsou

u prvoků rodu *Monocercomonoides* často druhově specifictí, proto považují za důležité uvést seznam hostitelů všech monocercomonoidů, kteří byli zahrnuti do fylogenetických analýz (vždy uveden název sekvence a druh hostitele).

TENE79 - *Testudo marginata*

BOA – *Boa constrictor*

LEI - *Leiocephalus carinatus*

OEV - *Ophisops elegans*

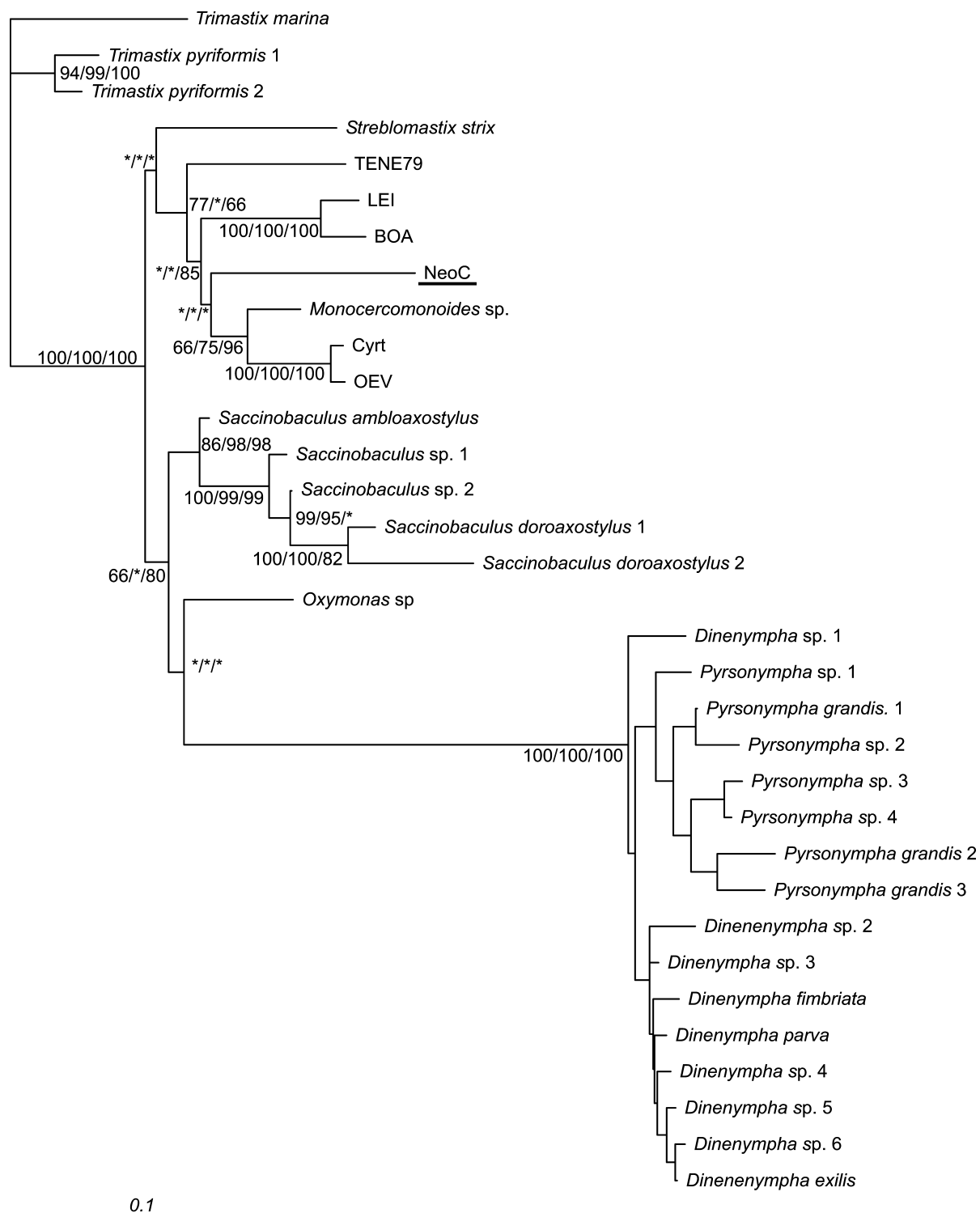
CYRT - *Cyrtodactylus kotschy*

Monocercomonoides sp. - *Chinchilla lanigera*

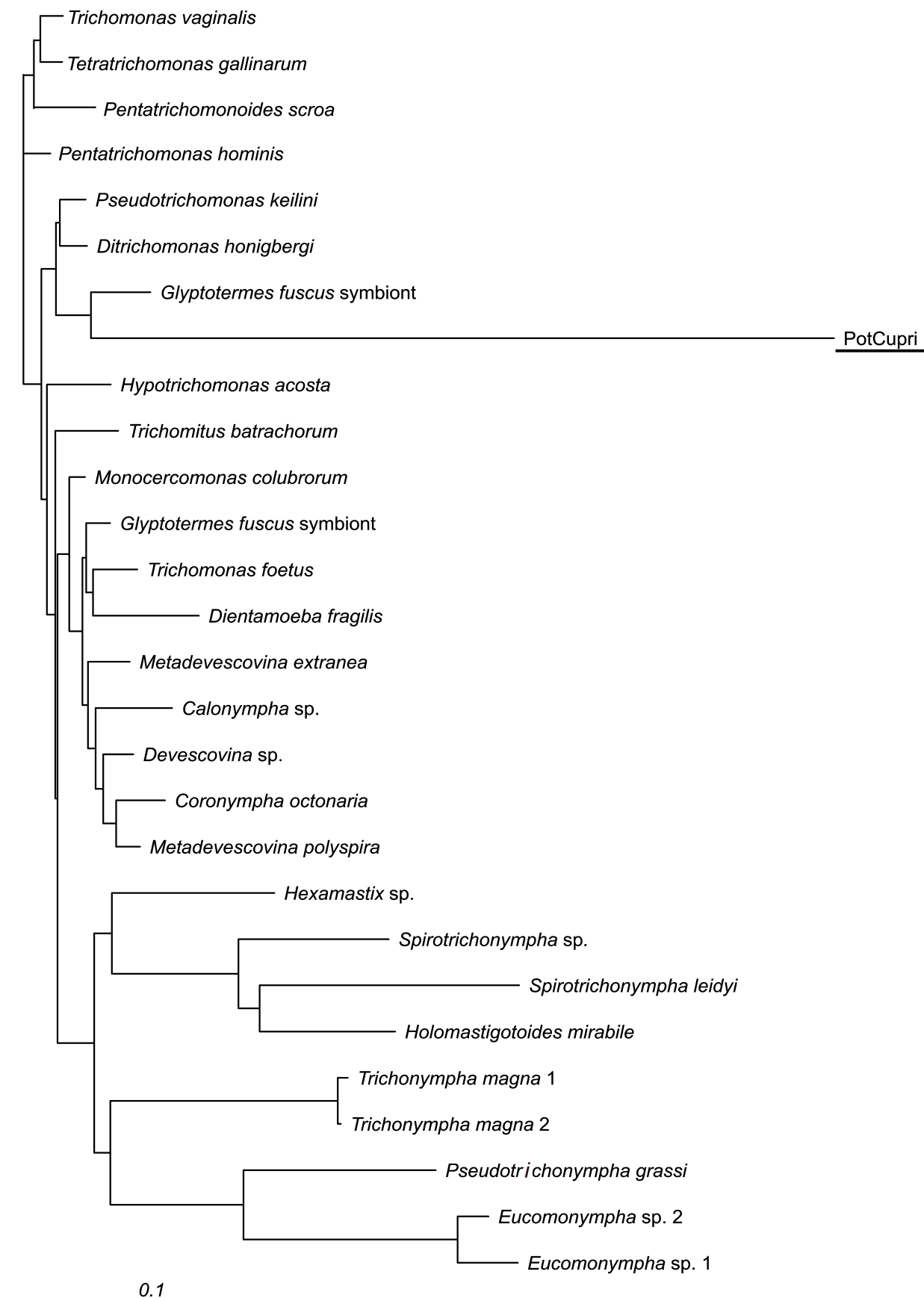
Neoc - *Neotermes cubanus*

Výsledkem fylogenetických analýz zahrnujících PotCupri je fylogenetický strom na obrázku 29. Tyto analýzy ukázaly, že jde o parabasalida s velmi divergentní sekvencí SSU rDNA, což se projevilo délkou větve tohoto organismu na fylogenetickém stromě. Bohužel pozice PotCupri v rámci skupiny Parabasala byla v závislosti na metodě velmi nestabilní, stejně tak i bootstrapová podpora byla velmi nízká (nikdy nepřesáhla hodnotu 50). Pro zpřesnění pozice se nabízí několik metod, například tzv. Slow-fast analýza odstraňující rychle mutující pozice. Každopádně výsledky naznačují, že se jedná o velmi zajímavý organismus – lze odhadnout, že jeho pozice v rámci parabasalid odpovídá samostatné čeledi či řádu.

obr. 28: fylogenetický strom zahrnující sekvenci NeoC



obr. 29: fylogenetický strom zahrnující sekvenci PotCupri



4. Závěr:

Během této práce bylo vyšetřeno 14 druhů hmyzích hostitelů. U dvanácti z nich byl zaznamenán výskyt střevních bičíkovců, převážně ze skupin Oxymonadida a Parabasala. Z jednoho oxymonádního prvoka a jednoho parabasalida byly získány kompletní sekvence SSU rDNA. Pomocí fylogenetických analýz byl oxymonadid zařazen do rodu *Monocercomonoides* a jedná se patrně o nový druh tohoto rodu. Zkoumaného parabasalida nejsou fylogenetické analýzy schopny zařadit do konkrétní skupiny v rámci kmene Parabasala, patrně se tedy jedná o nový rod, možná i čeleď.

Výsledky této práce jsou z vědeckého hlediska velmi zajímavé a do budoucna se chystá pokračování výzkumu v tomto směru.

5. Použitá literatura

- Brugerolle, G., Lee, J.J. (2000): Parabasalia. V: *Illustrated guide to the protozoa* (Lee, J.J. a kol., ed.), díl 2, strany 1196 – 1249.
- Čuřík, P. (2000): Brouci - zlatohlávci a nosorožci. V: *Hmyz - chov, morfologie* (Kovařík, F., a kol., ed.) strany 187 - 215. Madagaskar, Jihlava.
- Dryer, B.D. (1989): Phylum Zoomastigina Class Pyrsonymphida. In: *Handbook of Protozoa* (Margulis, L. a kol., ed.), strany 266 – 269. Jones and Barlett Publishers, Boston.
- Grell, K.G. (1967): Sexual reproduction in Protozoa. *Research in Protozoology* 2, 148 - 213.
- Hámpel V. (2005): Evolution of Metamonada. Dizertační práce. PřF UK v Praze, 47 stran
- Hausmann, K., Hülsmann, N. (2003): Protozoologie. Academia, Praha, 347 stran.
- Kulda, J., Nohýnková, E. (1978): Intestinal Flagellates. V: *Parasitic Protozoa, Intestinal Flagellates, Histomonads, Trichomonads, Amoeba, Opalinids, and Ciliates*, (Kreier, J. P., ed.), díl 2, strany 1 – 138. Academic Press, New York-London.
- Lang, J. a kol. (1971): Zoologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 381 stran.
- Maas, A., Radek, R. (2006): The gut flagellate community of the termite *Neotermes cubanus* with special reference to *Staurojoenina* and *Trichocovina hrdyi* nov. gen. nov. sp. *European Journal of Protistology* 42, 125 - 141.
- Rataj, K. (1996): Zlatohlávkovití I. Karel Rataj, Vimperk, 55 stran.

Prohlašuji tímto, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Ivana Čepičky Ph.D. a Mgr. Martina Kostky a uvedl v seznamu literatury veškerou použitou literaturu a další informační zdroje včetně internetu.

V Praze dne
