Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Bc. Vít Céza

Skrytá diverzita volně žijících trichomonád a jejich postavení v rámci skupiny Parabasalia

Cryptic diversity of free-living trichomonads and their phylogenetic position within Parabasalia

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 5. května 2011

Vít Céza

Na tomto místě chci poděkovat především mému školiteli RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph.D. za kvalitní vedení této diplomové práce. Dále chci poděkovat celému našemu kolektivu za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Děkuji též RNDr. Františku Šťáhlavskému, Ph.D. za sběr materiálu. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a své Verunce za pochopení a morální podporu. Velmi také děkuji svému dědovi, prof. RNDr. Janu Bucharovi, DrSc., za to, že mně byl po celý život velikou oporou a byl to právě on, kdo ve mně vzbudil lásku k přírodě a přivedl mě k jejímu studiu. Děkuji i grantové agentuře Univerzity Karlovy za financování projektu.

Obsah

ABSTRAKT **6**

ABSTRACT **7**

1. ÚVOD A CÍLE **8**

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED **9**

2.1. Hlavní charakteristiky skupiny Parabasalia 9

2.2. Systém 15

2.3. Pozice kořene fylogenetického stromu trichomonád 20

2.4. Ekologie trichomonád 20

2.5. Volně žijící trichomonády 21

3. MATERIÁL A METODY **27**

3.1. Izolace a kultivace 27

3.1.1. Izolace a kultivace nových vzorků 27

3.1.2. Příprava médií 27

3.1.3. Zamražování trichomonád 28

3.2. Morfologická a ultrastrukturní analýza 28

3.2.1. Pozorování živých bičíkovců 28

3.2.2. Barvení protargolem podle Bodiana 29

3.2.3. Transmisní elektronová mikroskopie 30

3.3. Izolace DNA 31

3.4. Amplifikace SSU rDNA 31

3.5. Gelová elektroforéza 32

3.6. Klonování a izolace plazmidů 32

3.6.1. Příprava ligační směsi 32

3.6.2. Příprava bakteriálních kolonií 32

3.6.3. Kolony PCR 33
3.6.4. Izolace a přečištění plazmidů 33
3.7. Sekvenace DNA 34
3.8. Vyhodnocení sekvencí a jejich analýza 34
4. VÝSLEDKY 36
4.1. Původ izolovaných linií a výsledky kultivací 36
4.2. Fylogenetická analýza 38
4.2.1. Přehled získaných sekvencí 38
4.2.2. Výsledek fylogenetické analýzy 38
4.3. Morfologie nových izolátů 42
4.3.1. *Pseudotrichomonas keilini* 43
4.3.2. Kmen LAGOS2M 45
4.3.3. *Lacusteria cypriaca* 45
4.3.4. Izolát VAV1A1 47
4.3.5. Kmen E2NT 48
4.3.6. Kmen LAGOS2D 52
5. DISKUZE 56
5.1. Získávání nových izolátů a sekvencí 56
5.2. Molekulárně-fylogenetická analýza 57
5.3. Identifikace nových rodů a druhů 58
5.4. Fenomén sekundárního volně žijícího způsobu života 60
5.5. Rozšíření volně žijících trichomonád 61
6. ZÁVĚREČNÉ SHRNUTÍ 63
7. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY 64
8. PŘÍLOHA 1 73

Abstrakt

Trichomonády (Parabasalia) jsou skupinou anaerobních jednobuněčných eukaryot. V současné době jsou řazeny do říše Excavata, přičemž toto zařazení bylo provedeno pouze na základě molekulárních analýz. Mezi trichomonády patří přes 400 převážně endobiotických druhů, z nichž zhruba 80 % žije v termitech. Volně žijících trichomonád bylo zatím popsáno pouhých šest druhů (*Pseudotrichomonas keilini*, *Ditrichomonas honigbergii, Monotrichomonas carabina, Honigbergiella* sp., *Tetratrichomonas undula* a *Lacusteria cypriaca*) tvořících čtyři nezávislé fylogenetické linie. Z toho nám se podařilo popsat nový rod a druh *Lacusteria cypriaca*. Všechny tyto linie jsou sekundárně volně žijící, to znamená, že se v rámci trichomonád vyvinuly ze svých endobiotických předků. Podařilo se nám také publikovat první dvě sekvence příslušející druhu *Pseudotrichomonas keilini*, morfologicky popsaného již v roce 1935. Na základě našich dat jsme přesunuli *Pseudotrichomonas keilini* ze skupiny Honigbergiellidae do čeledi Trichomonadidae (řád Trichomonadida).

Vedle těchto již publikovaných výsledků jsme získali dalších sedm nových kmenů volně žijících trichomonád (GOU23, CK, GR8, LAGOS2M, VAV1A1, E2NT, LAGOS2D), ze všech těchto kmenů jsme získali sekvenci genu pro SSU rRNA a provedli fylogenetickou analýzu. Tyto kmeny se rozpadly do čtyř linií. Ze současného nárůstu objevených linií volně žijících trichomonád jasně vyplývá, že jsou tyto trichomonády mnohem více diverzifikované, než se soudilo. Pět kmenů včetně *Lacusteria cypriaca* se nám podařilo převést do stabilní kultury, ze čtyř z nich jsme vytvořili monoeukaryotické kultury. Sedm kmenů jsme nabarvili protargolem a v současné době probíhá jejich charakterizace. Dvě kultury (LAGOS2D a E2NT) jsme připravili pro transmisní elektronový mikroskop a nyní probíhá studium jejich ultrastruktury. Předběžné výsledky jsou součástí této práce.

Fylogenetická pozice kmenů LAGOS2D a E2NT je nejasná. Tyto kmeny spolu vytváří samostatnou linii, která nejeví afinitu k žádné ze současných skupin trichomonád. Oba izoláty jsou morfologicky zajímavé. Izolát E2NT má neobvykle protaženou a pohyblivou přední část buňky, navíc se u něj vyskytuje pozoruhodný parabazální aparát tvaru dvou kroužků. Buňky izolátu LAGOS2D mají velkou kapsu, ze které vychází bičíky, tyto bičíky jsou navíc opatřeny ploutvičkami. Je možné, že jde o exkavátní znaky, které nebyly u trichomonád dosud nalezeny.

Klíčová slova: Diverzita, fylogeneze, Excavata, *Lacusteria*, linie, Parabasalia, SSU rDNA, volně žijící trichomonády.

Abstract

Trichomonads (Parabasalia) are anaerobic microeukaryotes classified in the supergroup Excavata. Inclusion of parabasalids within Excavata is exclusively based on the molecular-phylogenetic evidence. Over 400 species of parabasalids have been described so far, and the vast majority of them are endobiotic. In contrast, only few species of free-living parabasalids forming four independent lineages have been described (*Pseudotrichomonas keilini*, *Ditrichomonas honigbergii, Monotrichomonas carabina, Honigbergiella* sp., *Tetratrichomonas undula*, and *Lacusteria cypriaca*). *Lacusteria cypriaca* is a new species and genus described in our recent paper. In this paper we published the first two sequences of SSU rDNA from *Pseudotrichomonas keilini* as well. All of these lineages are likely secondarily free-living, and they developed from endobiotic ancestors.

In addition to the already published *Lacusteria cypriaca* and *Pseudotrichomonas keilini* strains, we have recently obtained seven another isolates of free-living trichomonads (LAGOS2D, E2NT, CK, LAGOS2M, GR8, GOU23 LIVADIAN, and VAV1A1); from all of these isolates we sequenced SSU rDNA and performed phylogenetic analyses. These isolates split into four independent evolutionary lineages, which indicate that free-living parabasalids are more diversed and phylogenetically interspersed than previously recognized. We also established stable cultures of five isolates (*Lacusteria cypriaca*, LAGOS2D, E2NT, LIVADIAN and VAV1A1). We stained 7 isolates with protargol and examined two of them (LAGOS2D, E2NT) by transmission electron microcopy.

Phylogenetic position of LAGOS2D and E2NT is unclear. They have no affinities to any of six main groups within Parabasalia. In addition, they have some unique features such as unusual elongated and mobile part of cell anterior (E2NT) or flagella with vanes (LAGOS2D).

Key words: Diversity, phylogeny, Excavata, *Lacusteria*, lineage, Parabasalia, SSU rDNA, free-living trichomonads.

1. Úvod a cíle

Trichomonády (Parabasalia) jsou skupinou anaerobních jednobuněčných eukaryot patřících do říše Excavata. Protože u nich dosud nebyly nalezeny žádné exkavátní znaky, jsou trichomonády do exkavát řazeny pouze na základě výsledků molekulárně-fylogenetických analýz. Do současnosti bylo popsáno přibližně 450 převážně endobiotických druhů trichomonád. Největší pozornost byla po celou dobu věnována několika patogenním zástupcům. Představy o fylogenezi této skupiny podléhaly značným změnám. Velkým problémem při studiu fylogeneze trichomonád je nedostatek sekvenčních dat. Většina fylogenetických stromů trichomonád je založena na sekvencích genu pro SSU rRNA. V současné době tak nevíme, kde leží kořen skupiny Parabasalia, navíc nejsou jasné ani vztahy mezi hlavními liniemi. I z genomického a fylogenomického hlediska jsou trichomonády spíše méně studovanou skupinou. Pouze u lidského patogenu *Trichomonas vaginalis* byl již publikován genomový projekt (Carlton *et al*. 2007) a z několika dalších druhů (např. *Tritrichomonas foetus*, *Pentatrichomonas hominis*) je k dispozici několik tisíc EST sekvencí.

Velmi málo informací je známo o volně žijících trichomonádách. Dosud bylo popsáno šest druhů, tvořících čtyři nezávislé fylogenetické linie. Čtyři z těchto druhů byly navíc popsány až v posledních 10 letech. Podle fylogenetické pozice dosud popsaných druhů se usuzuje, že se vyvinuly z endobiotických předků a jejich způsob života je tudíž odvozený. Takový návrat k volnému způsobu života je u eukaryot výjimečný a kupodivu nebyla tomuto parazitologickému fenoménu věnována odpovídající pozornost. Navíc je možné, že v přírodě stále existuje primárně volně žijící trichomonáda, která ve stabilním anoxickém prostředí přežila dodnes. Takový nález by pomohl vyřešit stále aktuální a nezodpovězenou otázku pozice kořene fylogenetického stromu skupiny Parabasalia.

Cíle práce:

1. Získat co nejvíce izolátů volně žijících trichomonád, charakterizovat jejich habitaty a na základě získaných zkušeností vytipovat potenciální lokality pro budoucí odběry.
2. Pokusit se převést nové izoláty do stabilních kultur, získat z nich sekvenci genu pro SSU rRNA a provést fylogenetickou analýzu.
3. Morfologicky charakterizovat jednotlivé linie na základě protargolového barvení a u vybraných izolátů studovat ultrastrukturu buněk pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

2. Literární přehled

2.1. Hlavní charakteristiky skupiny Parabasalia

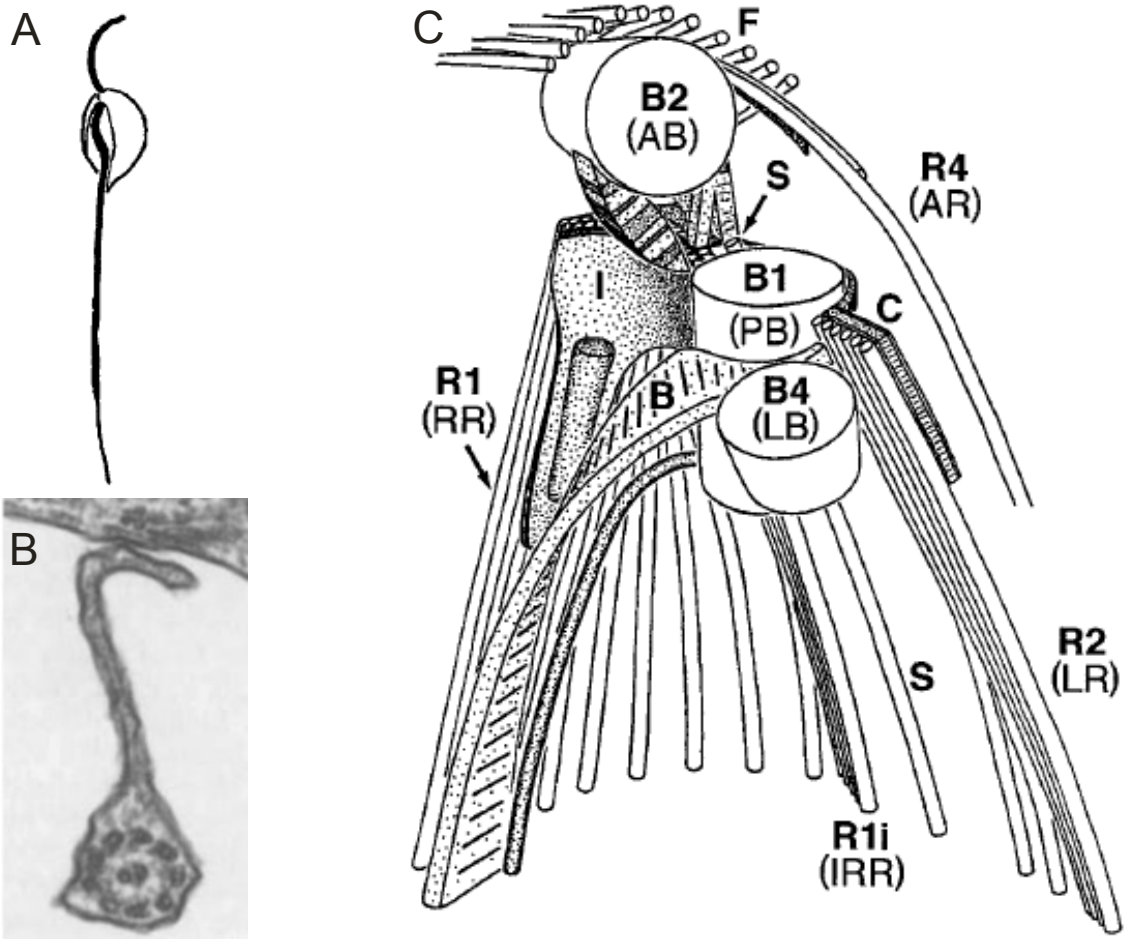
Trichomonády (Parabasalia) jsou v současné době řazeny do říše Excavata (Cavalier-Smith, 2002) a skupiny Metamonada (Cavalier-Smith, 2003). Nejbližšími známými příbuznými skupiny Parabasalia jsou pravděpodobně organizmy patřící do linie Fornicata (např. *Chilomastix*, *Retortamonas*, *Carpediemonas*, *Dysnectes*, *Giardia*, *Spironucleus*) (Hampl *et al*., 2009). Kromě Parabasalia a Fornicata patří mezi Metamonada ještě skupina Preaxostyla (Oxymonadida a *Trimastix*). Monofylie skupin Excavata a Metamonada je dodnes intenzivně diskutována (např. Hampl *et al*., 2005, 2009; Simpson *et al*., 2006). Zařazení skupiny Parabasalia mezi Excavata je postaveno čistě na základě výsledků molekulárně-fylogenetických analýz, neboť morfologické znaky exkavát, „exkavátní znaky" (charakteristické uspořádání cytoskeletu, ventrální potravní rýha; viz. obr. 1), u této skupiny zcela chybí (Cavalier-Smith, 2002; Simpson, 2003).

Tab. 1: Rozšíření exkavátních znaků u jednotlivých skupin říše Excavata. Převzato ze Simpson, 2003.

Feature	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Feeding groove	+	+	+	+	+	+	+			
I fibre	+	+	+	+	+	+	+	+		
B fibre	+	+	+	+	+			+		
C fibre	+	+	+	+	+			+	?	
Split R1	+	+	+	+	+	+	+			
Singlet root	+	+	+	+	+	?		+		
Flagellar vanes	+	+	+	+	+					
Composite fibre	+	ND	+	+	+					

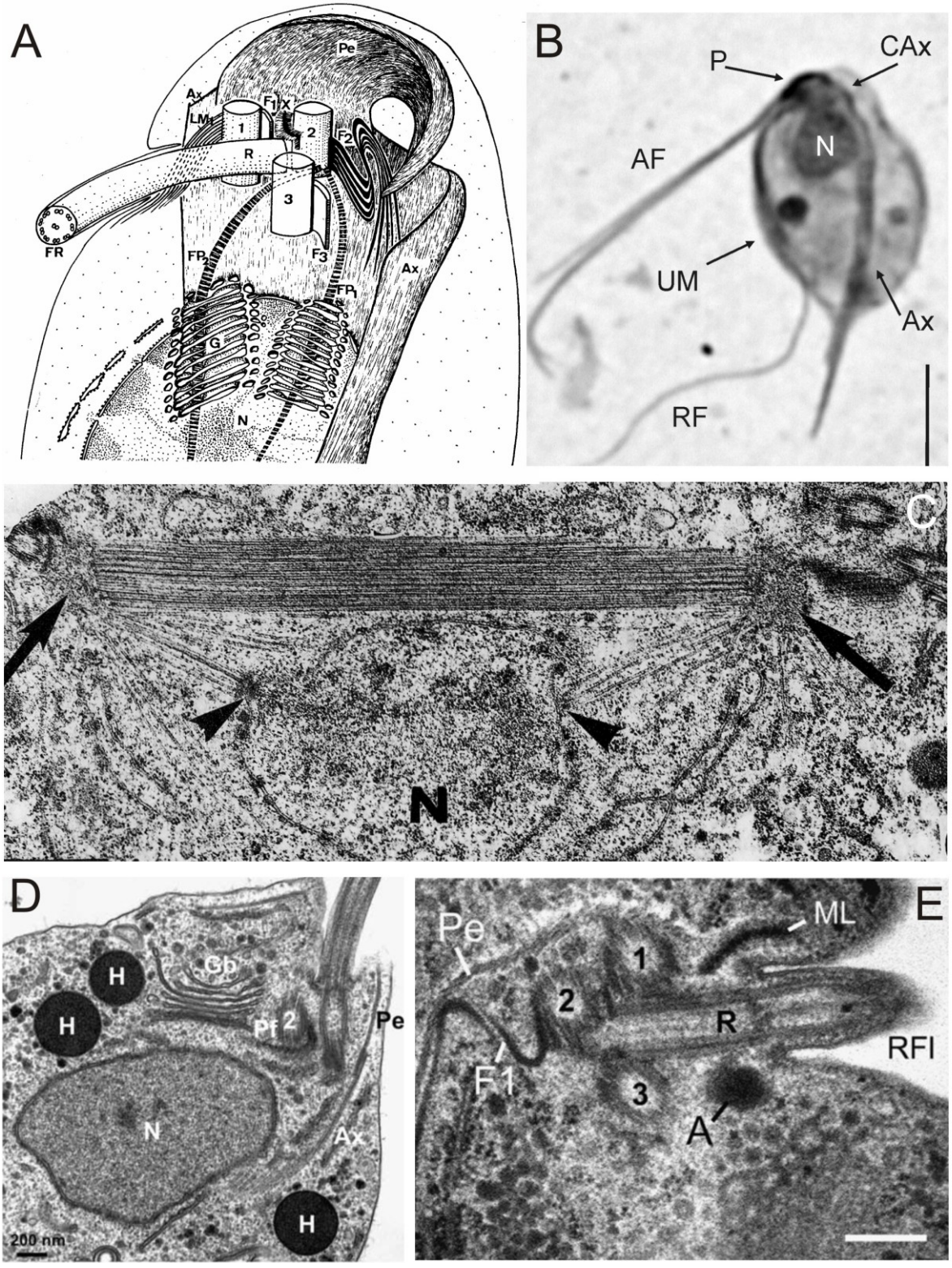
1 – Jakobida, 2 – *Malawimonas*, 3 – *Trimastix*, 4 – *Carpediemonas*, 5 – retortamonády, 6 – diplomonády, 7 – Heterolobosea, 8 – oxymonády, 9 – Parabasalia, 10 – Euglenozoa. + – přítomnost daného znaku, ? – pravděpodobná homologie, ND – nevěrohodná data.

Podle přítomnosti či nepřítomnosti exkavátních znaků lze v říši Excavata rozlišit čtyři skupiny. První skupinou jsou tzv. „exkavátní Excavata“ (Jakobida, *Malawimonas*, z Preaxostyla *Trimastix*, z Fornicata karpediemonády a retortamonády). Druhou skupinou jsou „částečně exkavátní Excavata“ (ještě zachována ventrální rýha; z Fornicata diplomonády, některá Heterolobosea). Třetí skupinou jsou „téměř neexkavátní Excavata“, která mají zachovány jen některé exkavátní cytoskeletální elementy (oxymonády – Preaxostyla). Čtvrtou skupinou jsou „neexkavátní Excavata“ (Parabasalia, Euglenozoa, některá Heterolobosea).



Obr. 1: Exkavátní znaky. A: Nákres typického exkaváta (*Carpediemonas membranifera*) s jedním předním bičíkem a jedním zpětným bičíkem, procházejícím ventrální potravní rýhou. B: Fotografie bičíku opatřeného ploutvičkou. C: Mastigont druhu *Carpediemonas membranifera*. B1, B2, B4 – bazální tělíska. B – fibrila B, C – fibrila C, F – dorzální vějíř periferních mikrotubulů, I – fibrila I, R1, R2, R3 – mikrotubulární kořeny, R1i – vnitřní část kořene 1, S – singletový kořen. A a C převzato ze Simpson, 2003; B převzato ze Simpson a Patterson, 2001.

Jednotlivé linie trichomonád sdílejí především tyto společné znaky: stavbu mastigontu a cytoskeletu, charakter Golgiho komplexu, přítomnost hydrogenozomů a kryptopleuro-mitózu.



Obr. 2. Charakteristické znaky trichomonád. A: Schématický nákres vystihující polohu taxonomicky významných struktur. Převzato z Brugerolle, 1976. B: Některé diagnostické znaky na preparátu *Hypotrichomonas acosta* nabarveném protargolem. Preparát zapůjčen prof. Kuldou. C: Kryptopleuromitóza. Převzato z Brugerolle, 1976. D, E: Pohled na některé významné znaky pod TEM. Převzato z Hampl *et al*., 2007. 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, UM – undulující membrána, N – jádro, Pe – pelta, X – struktura X, Rfl – adherující část zpětného bičíku, H – hydrogenozom.

Stavba mastigontu

Pohybový aparát skupin Hypotrichomonadea, Trichomonadea, Tritrichomonadea a některých zástupců skupiny Cristamonadea je postaven podle jednotného schématu. Výjimkou je bezbičíkatý rod *Dientamoeba* (Camp *et al*., 1974)[1]. Typický bičíkový aparát se sestává ze tří paralelních bazálních tělísek (kinetozomů) předních bičíků a kolmo umístěného bazálního tělíska zpětného bičíku (Brugerolle, 1991). U druhů, které obsahují více než čtyři bičíky, jsou bazální tělíska umístěna paralelně ke třem předním bičíkům. Výjimkou je rod *Ditrichomonas* (Farmer, 1993), který má dva páry na sebe kolmých bazálních tělísek, a rod *Histomonas*, u kterého není zpětný bičík vůbec vyvinut (Rybicka *et al*., 1972). Skupiny Trichonymphea, Spirotrichonymphea a někteří zástupci třídy Cristamonadea mají velký počet bičíků. U Cristamonadea je přítomný buď jeden nebo několik karyomastigontů, přičemž každý nese od dvou do několika stovek bičíků (viz Cepicka *et al*., 2010). Trichonymphea mají bilaterálně či tetraradiálně symetrické rostrum nesoucí bičíky (např. Brugerolle a Bordereau, 2004; Grimstone a Gibbons, 1966), přičemž během dělení se rostrum rozdělí na dvě hemirostra, každé se stane součástí jedné dceřiné buňky. U Spirotrichonymphea jsou bazální tělíska uspořádána do spirálních řad, během dělení jsou rozdělena mezi dceřiné buňky (např. Brugerolle, 2001; Brugerolle a Bordereau, 2004; Radek, 1997).

Hlavním znakem odlišujícím od sebe rody trichomonád je počet bičíků (Honigberg, 1963). V některých případech se druh liší počtem bičíků od ostatních příslušníků svého rodu, např. *Tritrichomonas nonconforma* má čtyři přední bičíky místo třech (Honigberg, 1963). U některých druhů zase pozorujeme jedince s menším počtem bičíků (např. Honigberg, 1951; Honigberg, 1963; Yubuki *et al*., 2010). Zřejmě jde o stav u mladých buněk po dělení.

Bazální tělíska jsou vůči sobě a ostatním buněčným strukturám fixována pomocí charakteristických fibril (viz Brugerolle, 1976; obr. 2). Z bazálních tělísek 1 až 3 vybíhají kořenové fibrily F1 až F3. Kořenová fibrila F2 se nazývá sigmoidální lamela a napojuje se na pelto-axostylární spojení. Mezi bazálními tělísky 1 a 2 probíhá struktura X napojující se na bazální tělísko zpětného bičíku. Tato struktura se pravděpodobně účastní vzájemné fixace kinetozomů. Z bazálního tělíska 1 vychází marginální lamela směrem k přední části zpětného bičíku. Některé rody trichomonád mají v mastigontu vyvinuty další struktury (infrakinetosomální tělísko, suprakinetosomální tělísko a hřebenovitou strukturu).

[1] Améboidní bezbičíkaté formy umí vytvořit i rod *Histomonas* (McDougald a Reid, 1978).

Undulující membrána a kosta

Undulující membrána usnadňuje pohyb ve vazkém prostředí. Je tvořená zpětným bičíkem asociovaným s povrchovým cytoskeletem. Může být různě dlouhá a strukturovaná, její charakter je jedním z diagnostických znaků. Je přítomna v šesti liniích: Hypotrichomonadea, Trichomonadida, Honigbergiellidae, Tritrichomonadidae, Simplicimonadidae a Cristamonadea. V současné době se nedá rozhodnout, zda byla undulující membrána přítomná již u společného předka trichomonád a pak se několikrát nezávisle ztratila, nebo zda se vyvinula konvergentně u výše uvedených linií (Cepicka *et al*., 2010).

Undulující membrána je v některých případech podepřena kostou (žíhaná fibrila specifická pro trichomonády). Existují dva typy kosty (A, B) odlišující se svým žíháním. Oba typy kosty jsou složeny z podobných proteinů (Brugerolle a Viscogliosi, 1994). Kosta typu A je typická pro rody *Tritrichomonas* a *Trichomitus* (např. Brugerolle, 1976). Typ B je vyvinut u rodů *Trichomonas* (Mattern *et al.*, 1967), *Tetratrichomonas* (Brugerolle, 1976), *Pentatrichomonas* (Honigberg *et al.*, 1968), *Pentatrichomonoides* (Brugerolle *et al.*, 1994), *Trichomitopsis* (Amos *et al*., 1979), *Pseudotrypanosoma* (Brugerolle, 1999) a *Cochlosoma* (Pecka *et al.*, 1996). U rodu *Hypotrichomonas* byla v mastigontu nalezena struktura připomínající bázi kosty typu A, tzv. rudimentární kosta (Lee, 1960). U skupiny Cristamonadea je kosta nahrazena krestou, silnou fibrilou podpírající bázi zpětného bičíku (Brugerolle, 1976). Stejně jako v případě undulující membrány ani u kosty není možné rozhodnout, zda byla přítomna u společného předka všech trichomonád nebo zda se vyvinula později.

Pelta a axostyl

Pelta a axostyl tvoří dominantní opornou strukturu buněk trichomonád. U rodu *Dientamoeba* nejsou tyto struktury přítomny (Camp *et al*., 1974). Obě struktury sestávají z paralelních mikrotubulárních pásů a přiléhají k sobě v apikální části peltoaxostylárním spojením. Proximální část axostylu (kapitulum) je rozšířená a částečně objímá jádro. Distální konec axostylu obvykle vyčnívá ven z buňky. Na rozdíl od axostylu oxymonád není kontraktilní (Brugerolle, 1991). Rozlišujeme dva typy axostylů; 1) typ *Trichomonas* (např. Trichomonadea, Hypotrichomonadea), který se kontinuálně sužuje směrem k posteriornímu konci a 2) typ *Tritrichomonas* (Tritrichomonadidae, Simplicimonadidae, některá

Spirotrichonymphea a některá Cristamonadea), který je relativně silný a po celé délce má stejný průměr, na konci vytváří špičku.

Parabazální aparát

Jedná se o mohutně vyvinutý Golgiho systém asociovaný s žíhanými fibrilami. Žíhání má stejný charakter jako u kosty typu A. Parabazální aparát je natolik výrazný, že ho lze pozorovat pod světelným mikroskopem. Skupina Parabasalia dostala své jméno právě na základě této organely. Tvar parabazálního aparátu je jedním z diagnostických znaků. Převažuje dvouramenný typ (*Trichomonas*, *Trichomitus*, *Hypotrichomonas*). U rodu *Tritrichomonas* je parabazální aparát tyčovitý, u *Tetratrichomonas* a *Pentatrichomonas* je diskovitý.

Hydrogenozomy

Hydrogenozomy jsou sférické organely zapojené do energetického metabolizmu (Čerkasov *et al*., 1978; Lindmark a Müller, 1973). Jsou to deriváty mitochondrií obklopené dvojitou membránou, nemají vlastní genom (Turner a Müller, 1983). Jsou vyplněny granulární matrix (Benchimol, 2009). Mají podobný mechanismus transportu proteinů jako mitochondrie (např. Dolezal *et al*., 2005). V hydrogenozomu trichomonád je lokalizován metabolizmus pyruvátu (více informací o metabolizmu hydrogenozomů např. Hrdy *et al*., 2008).

Dělení buňky

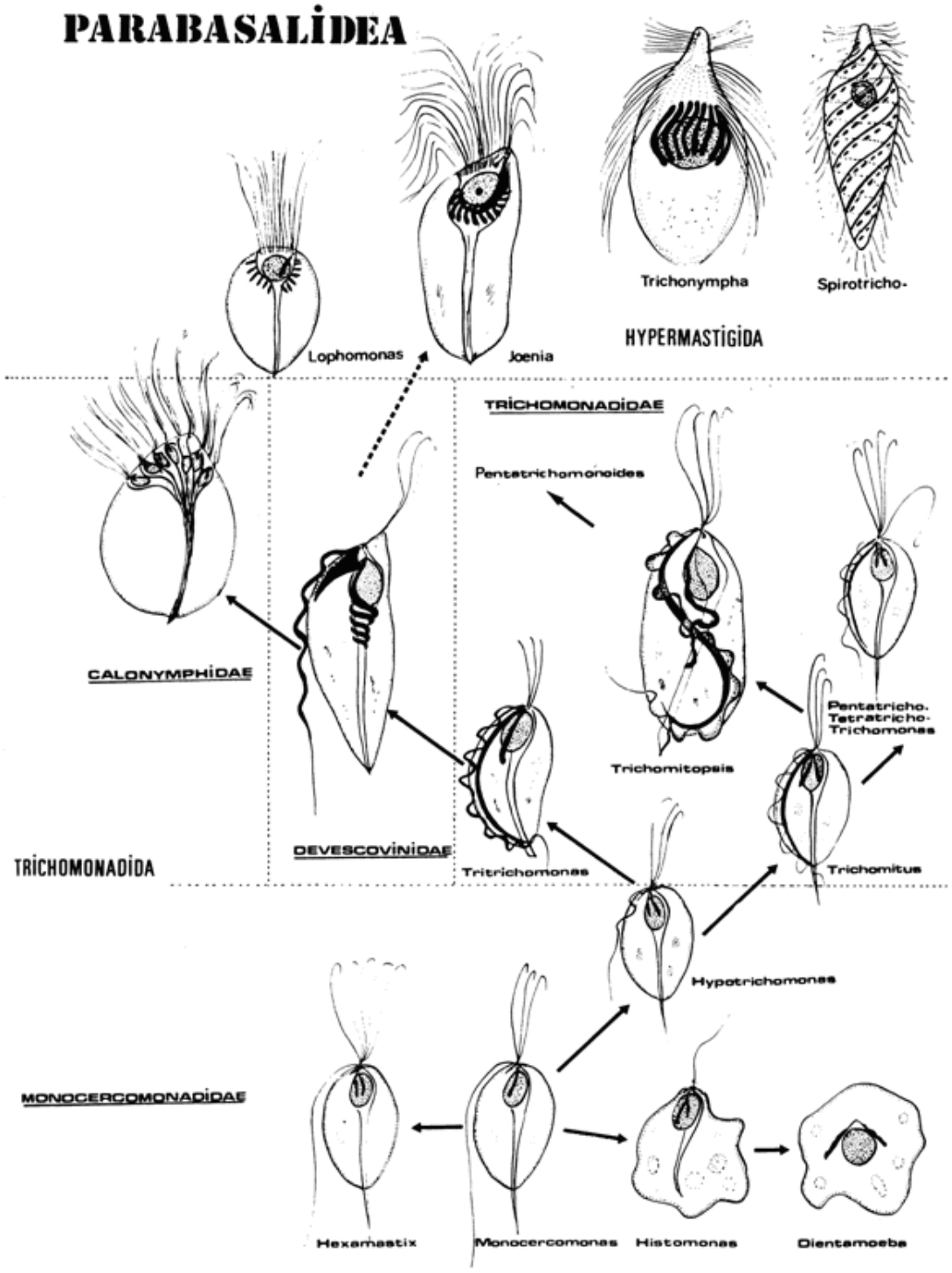
Kryptopleuromitóza (Brugerolle, 1975) je vysoce specifický typ jaderného dělení, při kterém se vytváří extranukleární dělící vřeténko. Jaderná membrána zůstává po celou dobu dělení zachována. Průběh dělení buňky je vysoce konzervativní a často druhově specifický proces. Nejdelším úsekem je u trichomonád interfáze. U rodu *Dientamoeba* je většina buněk ve stádiu pozdní telofáze (McDougald a Reid, 1978).

Tvorba trvalých stádií

Hlavním aktivním stádiem je trofozoit. V několika případech byla prokázána tvorba pravých cyst (Dolan *et al*., 2004; Farmer, 1993; Hampl *et al*., 2007). Běžnější jsou pseudocysty, kulovité buňky s internalizovanými bičíky a axostylem (Mattern *et al*., 1973), které na rozdíl od cyst nemají buněčnou stěnu. Jsou tvořeny za stresových podmínek.

2.2. Systém

Původní modely evoluce skupiny Parabasalia byly založeny pouze na morfologických znacích a systém této skupiny byl po čtyřicet let téměř neměnný (Brugerolle, 1976; Brugerolle, 1991; Honigberg, 1963).



Obr. 3: Dlouho přetrvávající představa evoluce skupiny Parabasalia podle morfologických znaků. Převzato z Brugerolle, 1986.

Parabasalia byla tvořena dvěma hlavními skupinami (Hypermastigida a Trichomonadida). Hypermastigida sdružovala druhy s velkými mnohobičíkatými buňkami obývající trávicí trakt termitů a dřevožravých švábů rodu *Cryptocercus*. Trichomonadida naproti tomu sdružovala druhy s malými a strukturně jednoduššími buňkami s maximálně šesti bičíky. V tomto systému byla za bazální považována skupina Monocercomonadidae. Patřili do ní prvoci, kteří nemají vyvinutou undulující membránu (*Monocercomonas*, *Hexamastix*, *Histomonas*, *Dientamoeba* a další). Rod *Hypotrichomonas* s undulující membránou, která však není podložena kostou, byl považován za přechodové stádium, vedoucí k „pravým" trichomonádám s vyvinutou undulující membránou i kostou (tehdejší čeleď Trichomonadidae). Podle tehdejší představy vznikly postupným zesložiťováním skupiny Devescovinidae a Calonymphidae. Úplným vývojovým vrcholem parabasalií byla Hypermastigida (obr. 3).

Po nástupu metod molekulární fylogenetiky se představy o evoluci skupiny Parabasalia velice změnily. Ukázalo se, že čeleď Monocercomonadidae je ve skutečnosti polyfyletická (např. Cepicka *et al*., 2010; Dacks a Redfield, 1998; Delgado-Viscogliosi *et al*., 2000; Hampl *et al*., 2004, 2006, 2007), přičemž mnoho provedených analýz naznačovalo, že předek trichomonád leží někde ve skupině Hypermastigida (Dacks a Redfield 1998; Delgado-Viscogliosi *et al*., 2000; Ohkuma *et al*., 2007), tedy opak k dřívějším představám vývoje složitějších forem z jednodušších.

Nejnovější systém (Cepicka *et al*., 2010) počítá s existencí šesti samostatných linií, Hypotrichomonadea, Trichomonadea, Tritrichomonadea, Cristamonadea, Trichonymphea a Spirotrichonymphea (obr. 4), nicméně vztahy mezi těmito liniemi jsou nejasné.

PHYLUM PARABASALIA (podle Cepicka *et al*., 2010)

Třída 1. Hypotrichomonadea

Řád 1. Hypotrichomonadida

Čeleď 1. Hypotrichomonadidae (*Hypotrichomonas*, *Trichomitus*)

Třída 2. Trichomonadea

Řád 1. Trichomonadida

Čeleď 1. Trichomonadidae (např. *Trichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas*, *Cochlosoma*)

Řád 2. Honigbergiellida

Čeleď 1. Honigbergiellidae (např. *Honigbergiella*, *Pseudotrichomonas*)

Čeleď 2. Hexamastigidae (*Hexamastix*, *Tetratrichomastix*)

Čeleď 3. Tricercomitidae (*Tricercomitus*)

Třída 3. Tritrichomonadea

Řád 1. Tritrichomonadida

Čeleď 1. Tritrichomonadidae (*Tritrichomonas*)

Čeleď 2. Dientamoebidae (např. *Dientamoeba*, *Protrichomonas*, *Histomonas*)

Čeleď 3. Monocercomonadidae (*Monocercomonas*)

Čeleď 4. Simplicimonadidae (*Simplicimonas*)

Třída 4. Cristamonadea

Řád 1. Cristamonadida

Čeleď 1. Lophomonadidae (např. *Lophomonas, Joenia, Devescovina, Calonympha*)

Třída 5. Trichonymphea

Řád 1. Trichonymphida

Čeleď 1. Hoplonymphidae (např. *Hoplonympha*, *Barbulanympha*)

Čeleď 2. Staurojoeninidae (např. *Staurojoenina*)

Čeleď 3. Trichonymphidae (*Trichonympha*)

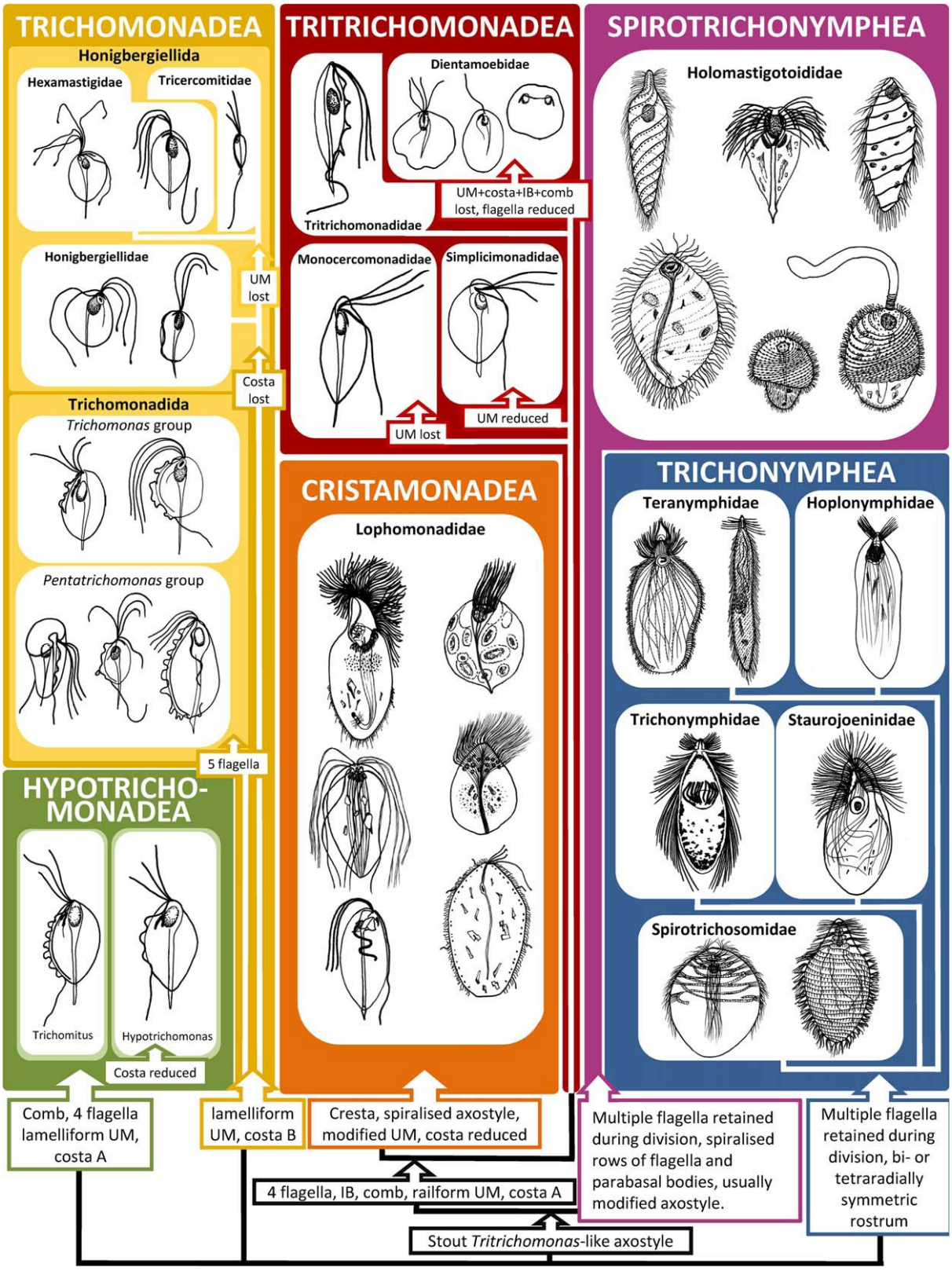
Čeleď 4. Teranymphidae (např. *Teranympha*, *Eucomonympha*)

Čeleď 5. Spirotrichosomidae (např. *Spirotrichosoma*, *Leptospironympha*)

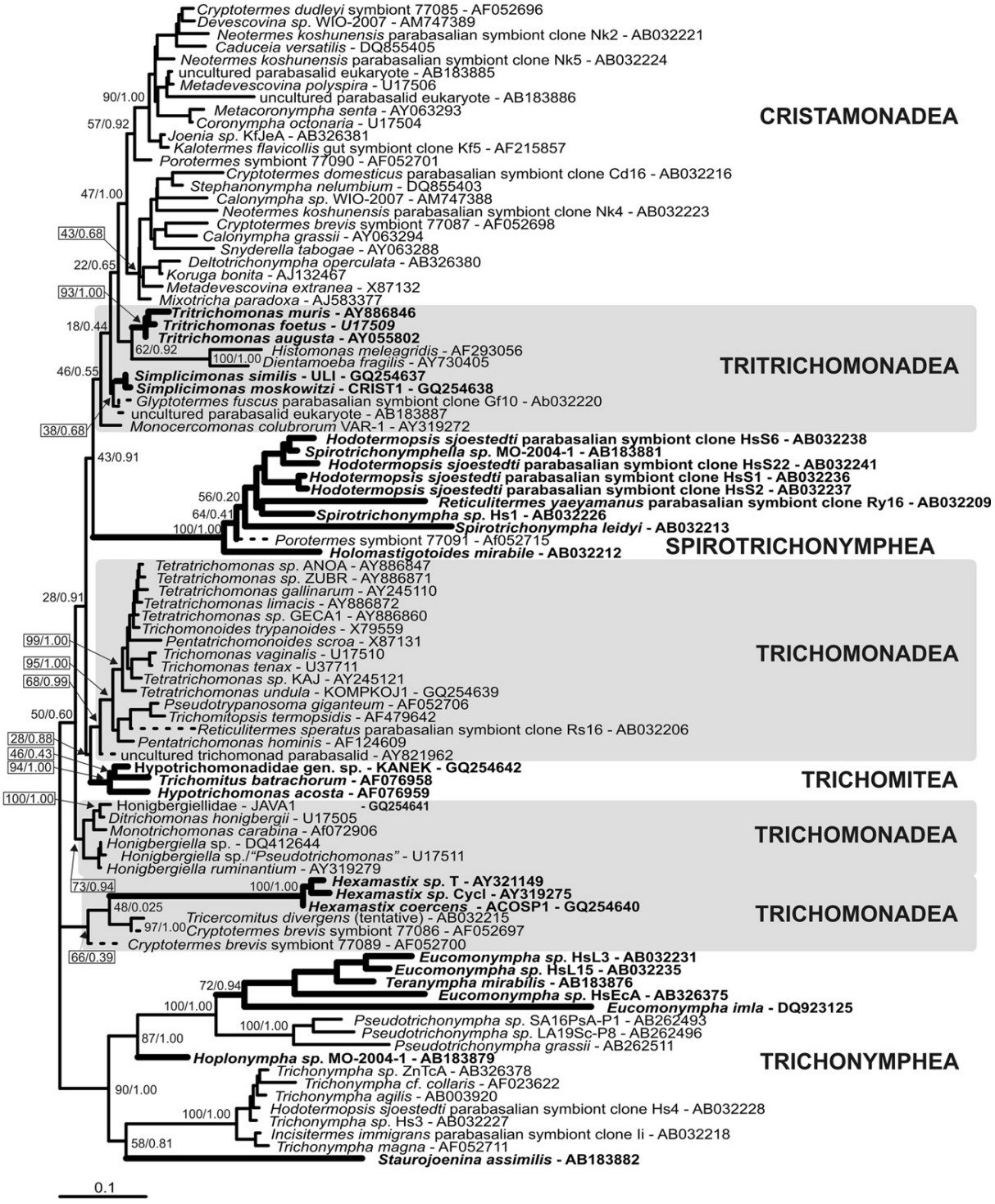
Třída 6. Spirotrichonymphea

Řád 1. Holomastigotoidida

Čeleď 1. Holomastigotoididae (např. *Holomastigotoides*, *Spirotrichonympha*)



Obr. 4: Schématické znázornění šesti hlavních linií skupiny Parabasalia a předpokládané vztahy mezi nimi. Evoluce významných morfologických znaků je uváděna v rámečcích. V případě kosty a undulující membrány není jasné, zda byly přítomny již u společného předka skupin Hypotrichomonadea, Trichomonadea a Tritrichomonadea, nebo zda se vyvinuly později. Převzato z Cepicka *et al.*, 2010.



Obr. 5: Fylogenetický strom skupiny Parabasalia založený na sekvencích genu pro SSU rRNA. Strom byl konstruován metodou ML v programu PAUP* (substituční model TrN + I + Γ). Hodnoty na uzlech představují statistickou podporu vyjádřenou hodnotami bootstrapu/Bayesovské posteriorní pravděpodobnosti. Převzato z Cepicka *et al*., 2010.

2.3. Pozice kořene fylogenetického stromu trichomonád

Asi největším problémem pro pochopení evoluce skupiny Parabasalia je neznalost pozice jejího kořene. Podle dřívějších morfologických hypotéz byl předkem poměrně jednoduchý organizmus s několika bičíky. Po nástupu molekulární fylogenetiky mnohé studie řadily kořen skupiny Parabasalia mezi řád Trichonymphida a zbytek skupiny Parabasalia, nebo mezi Trichonymphida a Spirotrichonymphida (např. Delgado-Viscogliosi *et al*., 2000; Gerbod *et al*., 2004; Keeling *et al*., 1988; Ohkuma *et al*., 2000). Analýza Hampl *et al*. (2004) výše uvedené výsledky zpochybnila s tím, že bazální pozice trichonymfidů může být výsledkem efektu LBA. Autorům Cepicka *et al*. (2010) se podařilo částečně odfiltrovat vliv LBA, což vedlo ke snížení podpory pro umístění kořene v linii Trichonymphea. K rozřešení problému umístění kořene a evoluce ve skupině Parabasalia by pomohl nález organizmu, který by byl této skupině blízce příbuzný, podobně jako volně žijící rod *Trimastix* a parazitické oxymonády nebo rod *Carpediemonas* a diplomonády.

2.4. Ekologie trichomonád

Naprostá většina z dosud popsaných cca 450 druhů trichomonád (viz Adl *et al*., 2007) jsou střevní mutualisti nebo komenzálové bezobratlých a obratlovců. Pouze několik druhů (především z hostitelsky úzce specifického rodu *Trichomonas*) proniklo ze střeva do dalších orgánů. Tyto druhy jsou pro své hostitele patogenní (Honigberg, 1963). Mezi patogenní druhy patří *Trichomonas vaginalis*, způsobující lidskou trichomonózu, což je nejčastější sexuálně přenosná nevirová choroba (Petrin *et al*., 1998). *Tritrichomonas foetus*[2] napadá urogenitální trakt skotu a způsobuje např. neplodnost a potraty (Cobo *et al*., 2001). *Histomonas meleagridis* invaduje primárně slepé střevo hrabavých ptáků a je schopen tvořit améboidní formy, které napadají další orgány (Bishop, 1938; Lund *et. al.*, 1967). Významným patogenem je také *Trichomonas gallinae*, který napadá ptáky, především měkkozobé a dravce (např. Bunbury *et al*., 2007; Stabler, 1954). Vedle těchto významných patogenů existuje několik dalších mírně patogenních zástupců, např. *Dientamoeba fragilis* (Johnson *et al*., 2004).

Hlavní centrum diverzity trichomonád je střevo termitů, ve kterém se vyskytují obří mnohobičíkaté formy, které termitům pomáhají trávit celulózu a jsou pro ně nezbytné (např.

[2] *Tritrichomonas foetus* je identický s *T. suis* ze střeva a nosní dutiny prasat (Tachezy *et al*., 2002).

Brugerolle a Radek, 2006; Li *et al*., 2006). Trichomonády prostřednictvím termitů přispívají k chodu globálního ekosystému (redistribuce půdních částic v savanách, produkce methanu).

Kromě endobiotických trichomonád je známo i několik volně žijících zástupců – viz kapitola 2.5.

2.5. Volně žijící trichomonády

Do roku 2011 bylo popsáno šest druhů volně žijících trichomonád, čtyři z nich v posledních deseti letech: *Pseudotrichomonas keilini*, *Ditrichomonas honigbergii*, *Monotrichomonas carabina*, *Honigbergiella* sp., *Tetratrichomonas undula* a *Lacusteria cypriaca* (Bernard *et al*., 2000; Bishop, 1935; Cepicka *et al*., 2010; Farmer, 1993; Hampl *et al*., 2007; Yubuki *et al*., 2010). Tyto druhy byly nalezeny ve sladkovodních, brakických i mořských anoxických sedimentech v různých částech světa.

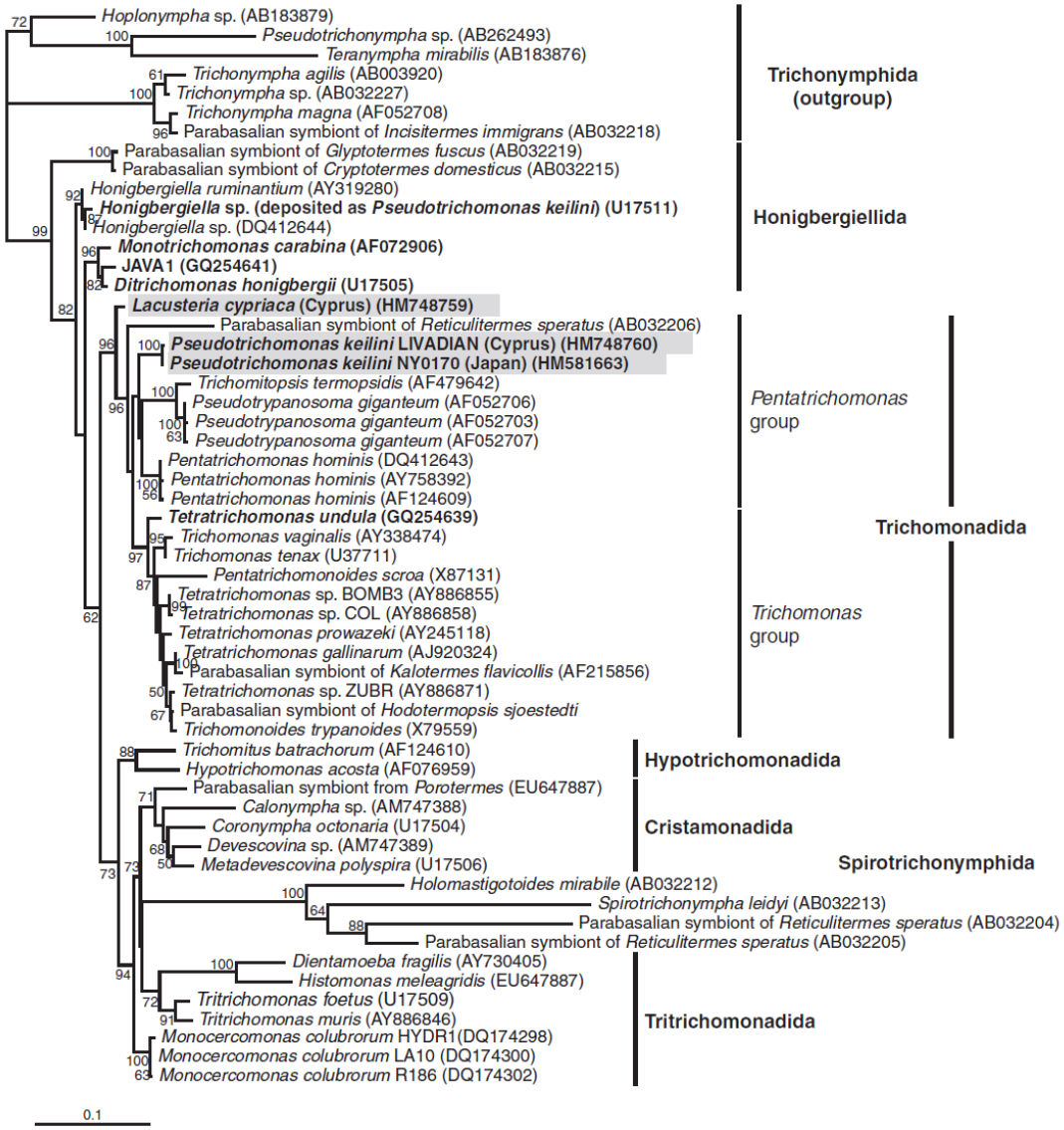
Tab. 2: Distribuce hlavních morfologických znaků u dosud popsaných volně žijících trichomonád.

Rod	Počet předních bičíků	Undulující membrána	Kosta	Volný konec zpětného bičíku	Typ axostylu
Pseudotrichomonas Keilini	3	+	-	-	typ *Trichomonas*
Ditrichomonas honigbergii	2	+	-	+	typ *Trichomonas*
Monotrichomonas carabina	1	+	-	+	typ *Trichomonas*
Honigbergiella sp.	3	-	-	+	typ *Trichomonas*
Tetratrichomonas undula	4	+	+	+	typ *Trichomonas*
Lacusteria cypriaca	3	+	-	+/-	typ *Trichomonas*

Dosud popsané volně žijící trichomonády se fylogeneticky rozpadají do čtyř nezávislých linií, **1**) **Honigbergiellida** (*Honigbergiella*, *Monotrichomonas*, *Ditrichomonas*), **2**) ***Tetratrichomonas undula***, **3**) ***Lacusteria cypriaca*** a **4**) ***Pseudotrichomonas keilini***.

Předek všech trichomonád byl stejně jako předek sesterské skupiny Fornicata (karpediemonády, diplomonády a retortamonády) volně žijící. Podle pozice volně žijících trichomonád na fylogenetickém stromu se usuzuje, že jsou volně žijící sekundárně (Delgado-Viscogliosi *et al*., 2000; Yubuki *et al*., 2010). Setkáváme se tak zde se vzácným parazitologickým fenoménem, a sice s opětovným vznikem volně žijícího stádia z endobiotických předků. Tento návrat k volnému způsobu života je u eukaryot zcela výjimečný a setkáváme se s ním ještě u některých diplomonád (Fornicata) a u druhu

Entamoeba moshkovskii (Archamoebae), a možná i u *Chilomastix cuspidata* (Fornicata) (Bernard *et al*., 1997; Kolisko *et al*., 2008; Silberman *et al*., 1999). Tomuto fenoménu kupodivu nebyla věnována odpovídající pozornost.



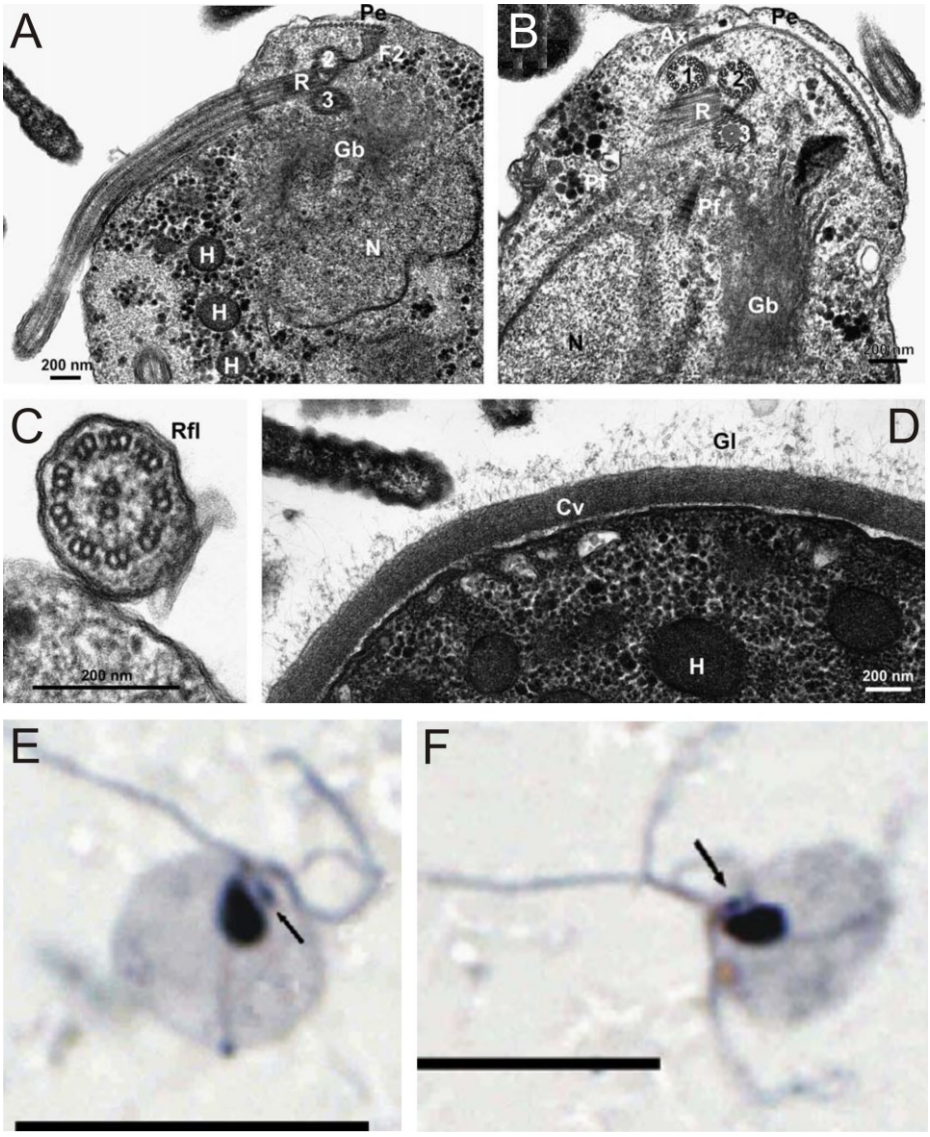
Obr. 6: Fylogenetické postavení dosud popsaných volně žijících trichomonád (Yubuki *et al.*, 2010). Fylogenetický strom sestrojený z 56 sekvencí genu pro SSU rRNA metodou ML. Tučně jsou zvýrazněny volně žijící trichomonády, v rámečcích jsou nově popsané sekvence.

1. Linie Honigbergiellidae

Autoři nového systému (Cepicka *et al.*, 2010) zařadili volně žijící druhy *Honigbergiella* sp., *Monotrichomonas carabina*, *Ditrichomonas honigbergii* a *Pseudotrichomonas keilini* do skupiny Honigbergiellidae, nicméně ještě v tomtéž roce se zjistilo (Yubuki *et al*., 2010), že rod *Pseudotrichomonas* ve skutečnosti nepatří mezi Honigbergiellidae, ale tvoří samostatnou větev uvnitř řádu Trichomonadida.

***Honigbergiella* sp.**

Tento druh má tři přední bičíky (Hampl *et al*., 2007). Chybí mu undulující membrána, kosta, infrakinetozomální i komb-like tělísko. Byla u něj prokázána tvorba pravých cyst s buněčnou stěnou, internalizovanými bičíky a granulovanou cytoplazmou (obr. 7). Tomuto druhu je morfologicky velmi podobný druh *Honigbergiella ruminantium*, který žije v trávicím traktu krav. Oba druhy mají velmi podobnou sekvenci SSU rDNA (odlišnost pouze ve 27 nukleotidech = 2% divergence). Nelze vyloučit, že byl sediment, ze kterého byl odebrán izolát *Honigbergiella* sp., kontaminován trusem skotu, a tudíž že je *Honigbergiella* sp. ve skutečnosti endobiotický druh. Je tu ovšem i možnost, že *Honigbergiella* sp. patří do druhu *H. ruminantium*, který by tedy byl jak volně žijící, tak endobiotický (více kap. 5.4.).



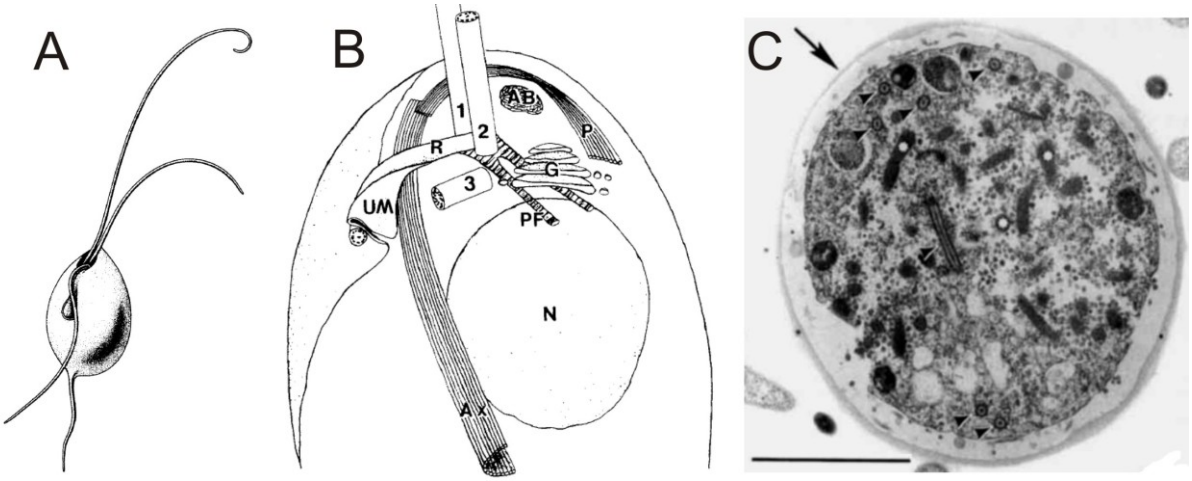
Obr. 7: Fotografie ultrastruktury (A-D) a protargolových preparátů (E,F) druhu *Honigbergiella* sp.. A-C: mastigont, D: cysta. 1, 2, 3, R – bazální tělíska, Ax – axostyl, Cv – stěna cysty, Gb – Golgiho aparát, Gl – glykokalyx, H – hydrogenozom, N – jádro, Pe – pelta, Pf – parabazální fibrila, Rfl – zpětný bičík, F2 – sigmoidální lamela. Šipka u protargolového preparátu znamená parabazální aparát. Podle Hampl *et al*., 2007. Měřítko u protargolového preparátu 5 μm.

Monotrichomonas carabina Bernard, Simpson & Patterson, 2000

Popis tohoto druhu je velmi málo konkrétní, nicméně z něj jasně vyplývá, že jde o nový druh, protože *M. carabina* má pouze jeden přední bičík. Zpětný bičík tvoří undulující membránu. Byl izolován z lokality Quibray (New South Wales, Austrálie).

Ditrichomonas honigbergii Farmer, 1993

Ditrichomonas honigbergii má dva přední bičíky (obr. 8A). Délka undulující membrány je velice variabilní. Bičíkový aparát je tvořen čtyřmi bazálními tělísky, jejich uspořádání je unikátní, neboť vytváří dva na sebe kolmé páry (obr. 8B). *D. honigbergii* tvoří pravé cysty s internalizovanými bičíky a elektrondenzní stěnou, tvořenou specifickými fibrilami. Cytoplazma těchto cyst je hodně granulovaná (obr 8C). Tento druh byl nalezen ve sladkovodním jezeru Enriquillo v Dominikánské republice.

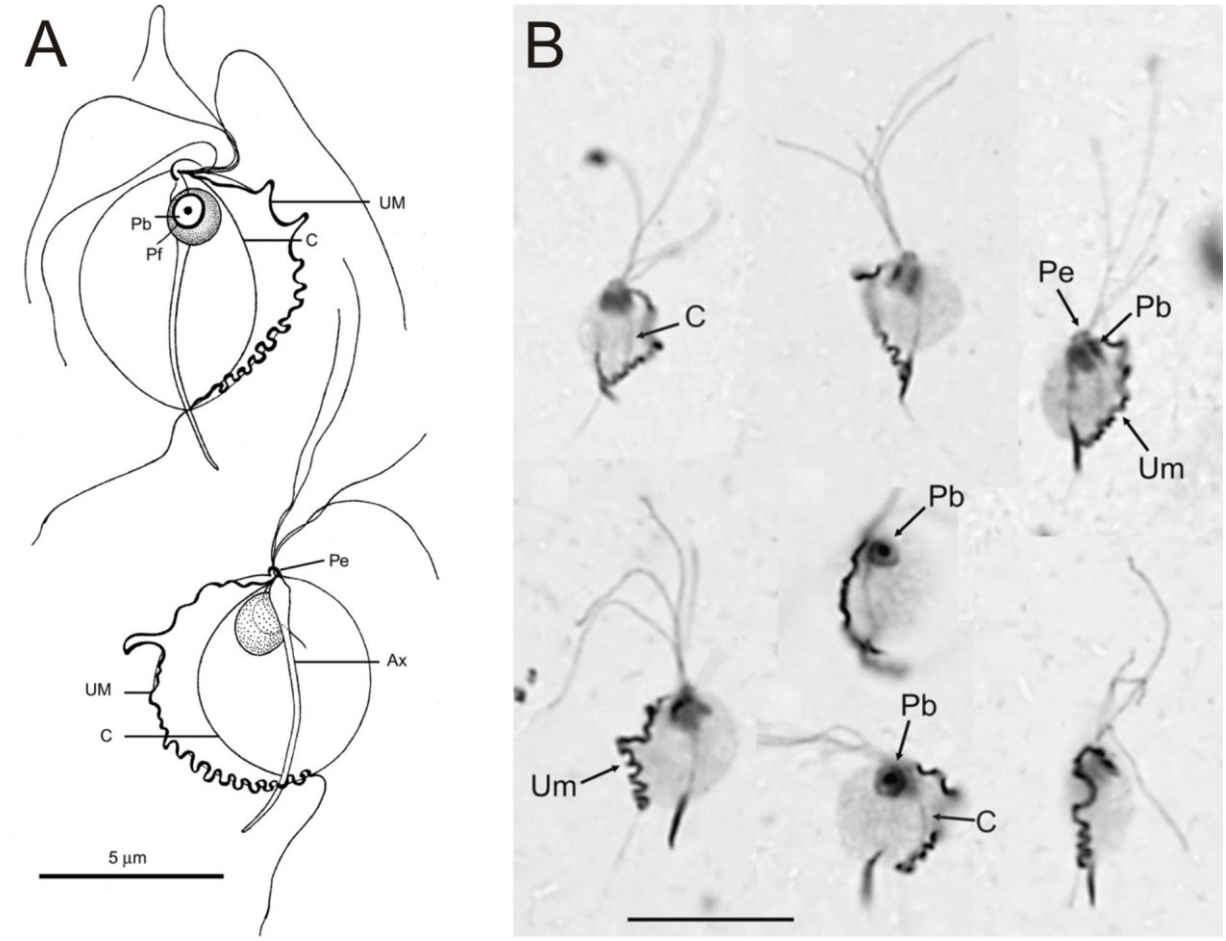


Obr. 8: ***Ditrichomonas honigbergii*****.** A: Schématický nákres trofozoita *D. honigbergii*, B: Bičíkatý aparát s dvěma na sebe kolmými páry bazálních tělísek. C: Cysta s internalizovanými bičíky, hydrogenozomy a amorfní stěnou cysty (viz šipka). 1, 2, 3 – přední bičíky, R – zpětný bičík, N – jádro, Ax – axostyl, G – golgi, P – pelta, PP – parabazální fibrily. Podle Farmer, 1993. Měřítko 2,5 μm.

2. Linie *Tetratrichomonas undula*

Tetratrichomonas undula Cepicka, Hampl & Kulda, 2010

Tato trichomonáda (obr. 9) má čtyři přední bičíky, zpětný bičík vytváří velmi dobře vyvinutou undulující membránu s mnoha záhyby. U buněk se krátce po dělení vyskytují pouze tři přední bičíky. Kosta je slabá, parabazální aparát je velký, diskovitý, pelta je tenká a krátká. Izolát byl získán z kompostu v České republice. Nález rozšiřuje již tak širokou ekologickou valenci tetratrichomonád.

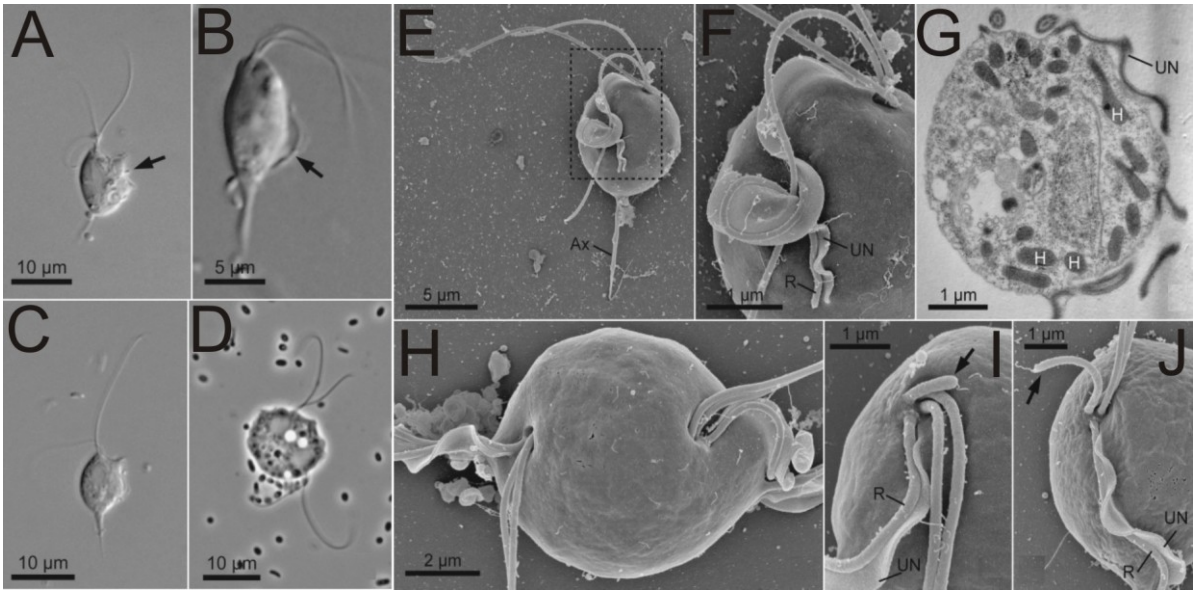


Obr. 9: Schématický nákres (A) a protargolem nabarvené buňky (B) druhu *Tetratrichomonas undula*. Ax – axostyl, C – kosta, Pb – parabazální aparát, Pe – pelta, Pf – parabazální fibrila, Um – undulující membrána. Podle Cepicka *et al*., 2010. Měřítko 10 µm.

3. Linie *Pseudotrichomonas keilini*

Pseudotrichomonas keilini (Bishop, 1939)

Jde o první popsaný druh volně žijící trichomonády. Byl opakovaně izolován po celý rok ze sedimentu sladkovodního jezera v hrabství Lincolnshire v Anglii. Autoři Cepicka *et al*. (2010) ho na základě morfologických znaků (absence infrakinetozomálního tělíska, komb-like struktury, kosty, a přítomnosti lameliformní undulující membrány a třech předních bičíků) zařadili v novém systému mezi Honigbergiellidae, nicméně sekvence od *Pseudotrichomonas keilini* neexistovala. Pravé kultury patřící druhu *Pseudotrichomonas keilini* se nám podařilo publikovat v roce 2010 (Yubuki *et al*., 2010) ze dvou odlišných biotopů. Jejich fylogenetická analýza ukázala, že se tyto dva izoláty větví uvnitř skupiny Trichomonadida, nikoli mezi Honigbergiellidae (více v 4.3.1).

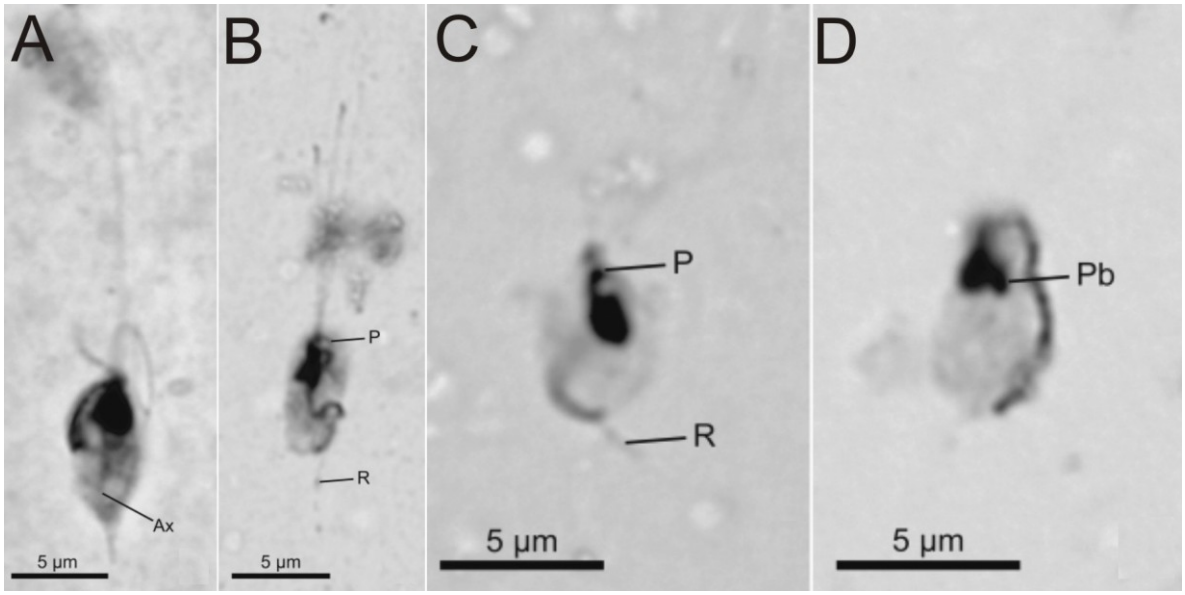


Obr. 10: ***Pseudotrichomonas keilini.*** A-D: Fotografie živých preparátů: A: Izolát z Japonska, B: Izolát z Kypru, C: Izolát z Japonska, buňka s pouze dvěma bičíky krátce po dělení, D: Dělící se buňka izolátu z Japonska, jsou vidět dvě jádra a dva páry předních bičíků. E-J: Buňky pod transmisním elektronovým mikroskopem. Převzato z Yubuki *et al*. 2010.

4. Linie *Lacusteria cypriaca*

Lacusteria cypriaca Yubuki, Céza, Cepicka, Yabuki, Inagaki, Nakayama, Inouye & Leander, 2010

Tento druh má tři přední bičíky, zpětný bičík vytváří slabě vyvinutou undulující membránu s jediným záhybem. Délka undulující membrány je variabilní. Kosta chybí, volný konec zpětného bičíku je přítomen. Izolát *Lacusteria cypriaca* byl získán na Kypru. Více informací v kapitole 4.3.3.



Obr. 11: ***Lacusteria cypriaca*****.** Ax - axostyl, P - pelta, Pb - parabazální aparát, R - zpětný bičík. Převzato z Yubuki *et al*. 2010.

3. Materiál a metody

3.1. Izolace a kultivace

3.1.1. Izolace a kultivace nových vzorků

Nové izoláty byly získávány z anoxických/mikrooxických sedimentů. Získaný materiál byl vždy po 1ml přeočkován do médií Dobell-Leidlaw, ATCC #802 a média vzniklého kombinací obou předchozích.

3.1.2. Příprava médií

Dvoufázové médium podle Dobell-Leidlaw (1926), modifikováno

Pevná složka se skládala z 1,5 ml koagulovaného koňského séra. Sérum se nechalo rozmrazit těsně před rozplněním a pak se koagulovalo v šikmo položených skleněných zkumavkách v horkovzdušném sterilizátoru hodinu při 80 ^{o}C. Proces koagulace se opakoval po 24 hodinách. Zkumavky s hotovou pevnou složkou byly skladovány v lednici.

Tekutá složka média se skládala z 500 ml Ringerova roztoku a 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku. Dílčí roztoky A a B Ringerova roztoku byly připraveny a autoklávovány odděleně. Oba roztoky byly po zchladnutí opatrně smíchány. Tekutá složka média byla zkompletována přidáním 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku. Tekutá složka byla uchovávána v lednici.

Tab. 3: Složení Ringerova roztoku.

Roztok A	
NaCl	3,25 g
$NaHCO_3$	0,1 g
KCl	0,07 g
NaH_2PO_4 . H_20	0,005 g
Destilovaná H_2O	do 450 ml
Roztok B	
$CaCl_2$. $2H_2O$	0,08 g
Destilovaná H_2O	do 50 ml

Před vlastním použitím byla pevná složka převrstvena 3 ml tekuté složky.

Sonnebornovo parameciové médium (ATCC #802)

Pro přípravu média bylo odváženo 1,25 g Cereal Grass Media (Scholar Chemistry), tato navážka byla nasypána do destilované vody a povařena 5 minut. Po zchladnutí bylo médium přefiltrováno pomocí filtračního papíru, doplněno vodou do 500 ml a přelito do 0,5 l lahve. Poté bylo do lahve přidáno 0,25 g Na_2HPO_4. Hotové médium bylo následně autoklávováno.

Médium LB Broth

V 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 5 g LB Broth (Sigma), médium bylo poté autoklávováno.

Směs agaru a LB Broth na Petriho miskách

V 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 5 g LB Broth (Sigma), poté bylo do roztoku přidáno 6 g bakteriologického agaru (Oxoid). Médium bylo autoklávováno a po mírném ochlazení rozlito do Petriho misek.

3.1.3. Zamražování trichomonád

Volně žijící trichomonády byly zamraženy ve speciálních plastových zkumavkách, ve kterých byl 1ml kultury trichomonád a 50 µl DMSO. Každá kultura byla vždy zamražena v pěti paralelních zkumavkách. Zkumavky s kulturami a DMSO byly nejprve vloženy na noc do -80 °C a druhý den byly přeneseny do tekutého dusíku. Po týdnu byla vždy jedna z pěti paralelních zkumavek pokusně vymražena (plastová zkumavka se z tekutého dusíku vhodí do vody o teplotě cca. 40 °C, po rozmražení se obsah přeočkuje do média).

3.2. Morfologická a ultrastrukturní analýza

3.2.1. Pozorování živých bičíkovců

Nativní preparáty určené k fotografování byly pozorovány mikroskopem BX51 (Olympus) s použitím Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu a foceny kamerou Olympus DP71. Vzniklé snímky byly zpracovávány v programu Quick PHOTO CAMERA 2.3. Fotografie byly dále upraveny v programu Corel PHOTO-PAINT.

3.2.2. Barvení protargolem podle Bodiana

Fixace

Při fixaci se používala Bouin-Hollandova fixáž. Nejprve bylo v destilované vodě rozpuštěno 25 g octanu měďnatého, poté bylo přidáno a rozpuštěno 40 g kyseliny pikrové. Nakonec bylo do roztoku přidáno 100 ml 40% formaldehydu a objem byl doplněn destilovanou vodou do 1 l. Vzorky byly fixovány v Petriho miskách s 30 ml této fixáže a 1,5 ml ledové kyseliny octové.

Vzorky byly rozetřeny na čistá krycí sklíčka. Sklíčka byla kvůli snadnější manipulaci a rozlišení jednotlivých izolátů upevněna do předem připravených polyethylenových tyčinek. Na sklíčka byla nanesena malá kapka materiálu, tato kapka byla jedním tahem špičky pipety rozetřena po celém sklíčku. Jednotlivé suspenze byly na sklíčka zachyceny díky tomu, že médium Dobell-Leidlaw, na kterém byly kultury pěstovány, obsahuje bílek. V případě kultur LAGOS2M a LAI, které byly pěstovány na médiu ATCC #802, byla k suspenzi před roztěrem přidána kapka bílku. Ihned po rozetření bylo sklíčko vhozeno do Petriho misky s Bouin-Hollandovou fixáží nátěrem dolů tak, aby plavalo na hladině. Po několika minutách bylo obráceno nátěrem nahoru a ponořeno na dno. Tímto způsobem byly vzorky fixovány cca 10 minut. Druhý den byly preparáty opláchnuty v 50 % ethanolu a třikrát proprány v 70 % ethanolu (v 70 % ethanolu je možné vzorek ponechat delší dobu).

Vlastní barvení:

1. Preparáty konzervované v 70 % ethanolu byly převedeny přes 50 % ethanol do destilované vody.
2. Preparáty byly vloženy do 0,5 % roztoku manganistanu draselného na 5 minut.
3. Dále byly opláchnuty v destilované vodě pětkrát po 30 s.
4. Následně byly vloženy na 5 minut do 5 % roztoku kyseliny šťavelové.
5. Poté byly opět opláchnuty v destilované vodě pětkrát po 30 s.
6. V dalším kroku byla sklíčka vložena ve svislé poloze do kádinky, ve které byl 1 % roztok protargolu (Bayer, I. G. Farbenindustrie Actinengesellschaft). Na dno kádinky byl nejprve položen stočený a očištěný měděný drát (přibližně 5 g na 100 ml protargolu), dále byla nalita destilovaná voda, na jejíž hladinu byl nasypán protargol. Protargol byl ponechán, aby se samovolně rozpustil. Následně byla vložena sklíčka. Mezi naskládaná sklíčka byly nakonec vloženy tenké měděné drátky. Celá kádinka byla neprodyšně uzavřena a vložena na 48 hodin do 37 °C.

7. Nabarvené preparáty byly opláchnuty v destilované vodě dvakrát po 5 s.
8. Následně byly vloženy na 10 minut do redukčního roztoku (roztok 1 % hydrochinonu a 5% siřičitanu sodného ve vodě). Redukční roztok byl připraven vždy čerstvý přímo před použitím.
9. V dalším kroku byly preparáty opláchnuty v destilované vodě pětkrát po 30 s.
10. Poté byly vloženy na 5 minut do 0,5 % roztoku chloridu zlatitého.
11. Následovalo propláchnutí v destilované vodě dvakrát po 5 s.
12. Preparáty byly vloženy na 5 minut do 2 % roztoku kyseliny šťavelové.
13. Následovalo propláchnutí v destilované vodě pětkrát po 30 s.
14. Preparáty byly vloženy na 10 minut do 5 % roztoku thiosíranu sodného.
15. Preparáty byly proprány proudící vodovodní vodou (15 – 20 minut).
16. Poté byly převedeny alkoholovou řadou (50 %, 70 %, 80 %, 96 % a 100 % ethanol) do xylenu.
17. V posledním kroku byla sklíčka montována na podložní sklíčka do kapky DPX Mountant for histology (Sigma).

Nabarvené preparáty byly pozorovány mikroskopem OLYMPUS BX51 a fotografovány digitální kamerou OLYMPUS DP71. Pořízené fotografie byly zpracovávány v programu Quick PHOTO CAMERA 2.3 a dále upraveny v programu Corel PHOTO-PAINT. V některých případech byla pořízena série fotek různých hladin zaostření jednoho objektu a z této série byla v programu Helicon Focus složena výsledná fotografie.

3.2.3. Transmisní elektronová mikroskopie

1. Nejprve bylo připraveno 500 µl fixáže smícháním 2,5 % glutaraldehydu v 0,1 M kakodylátovém pufru s $CaCl_2$ tak, aby výsledná koncentrace $CaCl_2$ byla 5 mM.
2. Z každé kultury byly odebrány 2 ml, tyto objemy byly stočeny 10 minut na 1000 G. Po stočení byl odebrán supernatant a pelet byl resuspendován.
3. Pelet byl přelit připravenou fixáží, opatrně promíchán a předán pracovníkovi Laboratoře elektronové mikroskopie a dále zpracováván standardní metodikou zahrnující kontrastování uranylacetátem, odvodnění, zalití do epo-aralditu, nařezání na ultramikrotomu, namontování na síťky a barvení sloučeninami těžkých kovů.

Jednotlivé řezy byly pozorovány na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta. Snímky byly zpracovány v programu Olympus Soft Imaging Solution.

3.3. Izolace DNA

Kultury byly před vlastní izolací zahuštěny centrifugací (10 minut, 1500 rpm). Ve zkumavce bylo ponecháno 200 µl peletu a tento pelet byl resuspendován. DNA byla izolována kitem DNeasy Blood® & Tissue Kit (Qiagen) podle protokolu „Purification of total DNA from animal blood or cells (spin – column protocol).“ DNA byla dlouhodobě uchovávána v -20 °C.

3.4. Amplifikace SSU rDNA

Sekvence genu pro SSU rRNA byla získána pomocí primerů 16SF (TACTTGGTTGAT-CCTGCC; Tachezy *et al*., 2002) a 16SRR (TCACCTACCGTTACCTTG; Cepicka *et al*., 2005). Tato sekvence má u trichomonád délku kolem 1600 nukleotidů.

Tab. 4: Složení reakční směsi pro amplifikaci SSU rDNA.

Sterilní miliQ H_2O	doplnit do 50 µl
PCR pufr (10x konc.)	5 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	4 µl
dNTP (2 mM)	2,5 µl
16SF	12,5 pmol
16SRR	12,5 pmol
Nativní Taq polymeráza bez BSA (Fermentas)	0,5 µl
BSA	0,5 µl
DNA	až 5 ng

Nastavení PCR cykleru pro primery 16SF a 16SRR:

1x	počáteční denaturace	94°C	1 min
31x	denaturace	94°C	1 min
	nasedání primerů	58°C	1 min
	polymerace	72°C	2 min 30 s
1x	závěrečná polymerace	94°C	10 min

Kvalita a koncentrace amplifikovaných fragmentů byla ověřována elektroforézou (viz kap. 3.5.). Amplifikovaná DNA byla skladována v -20 °C.

3.5. Gelová elektroforéza

Elektroforéza byla prováděna na 1% horizontálním agarózovém gelu. Amplifikované fragmenty byly zviditelněny přidáním ethidiumbromidu (finální koncentrace 0.5 $\mu g/ml^{-1}$). Výsledný obraz po nasvícení UV byl vyfocen digitálním fotoaparátem a zpracován programem Alpha Digi Doc RT.

Ve všech případech se naamplifikoval jediný pruh s fragmenty požadované délky, a nebylo tudíž nutné přistoupit k vyříznutí a přečištění jednotlivých pruhů. Výsledný PCR produkt byl přečištěn pomocí kitu QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) podle protokolu „QIA Quick PCR purification using a microcentrifuge“. Výsledná koncentrace DNA ve vzorku byla zjištěna na spektrofotometru (NanoDrop® ND-1000).

Sekvence kmenů VAV1A1 a E2NT bylo nutné zaklonovat. V případě VAV1A1 bylo nutné klonovat z důvodu výskytu dvou druhů trichomonád. V případě E2NT jsme museli klonovat kvůli velmi nízkým výtěžkům po amplifikaci.

3.6. Klonování a izolace plazmidů

Pro klonování byl použit kit pGEM® T-Easy Vector System (Promega) a kompetenční buňky *Escherichia coli* JM109 Competent Cells (Promega).

3.6.1. Příprava ligační směsi

Mimo prostor laboratoře byly namíchány ligační směsi. Pro reakci byla použita T4 ligáza (1µl), pGEM plazmidy (1µl), ligační pufr (5µl) a DNA (50 ng – v našem případě pokaždé 3 µl). T4 ligáza byla po celou dobu na ledu, směs byla po přidání ligázy rychle zkompletována. Ligace proběhla přes noc ve 4 ^{o}C.

3.6.2. Příprava bakteriálních kolonií

1. Ke 100 µl kompetenčních buněk bylo přidáno 10 µl ligační směsi. Vzniklá směs byla ponechána 20 minut na ledu.
2. Poté byla směs vložena na 45 sekund do 42 ^{o}C. Následně byly vzorky přeneseny na 2 minuty na led.
3. Ke každému vzorku bylo přidáno 800 µl LB média. Po přidání byly vzorky inkubovány 1,5 hodiny ve třepačce (220 rpm, 37 °C).

4. Mezitím byla připravena směs na potírání Petriho misek, ve kterých byl již ztuhlý roztok LB Broth s agarem. Směs sestávala z 25 µl ampicilinu (100 $\mu g.ml^{-1}$), 100 µl IPTG (100 mM) a 20 µl X-gal (50 $\mu g.ml^{-1}$) pro každou plotnu. Po nanesení této směsi byla na plotnu také rozetřena suspenze narostlých bakteriálních buněk s plazmidy. Plotny byly poté vloženy do termostatu (37 °C) a ponechány růst do druhého dne.

3.6.3. Colony PCR

Pro ověření úspěšnosti klonování bylo z každé plotny vybráno několik kolonií (obvykle 8 – 12) a tyto kolonie byly přeneseny do mikrozkumavky s 10 µl vody. Mikrozkumavky byly přeneseny do termocykléru, v němž byl spuštěn program na zničení buněčných stěn a uvolnění DNA:

1x	96 °C	5 min
1x	50 °C	1,5 min
1x	96 °C	1,5 min
1x	45 °C	1 min
1x	96 °C	1 min
1x	40 °C	1 min

Získaná DNA byla použita pro amplifikační PCR. V této amplifikační reakci byly použity primery SP6 (GATTTAGGTGACACTATAG) a T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) komplementární k vektoru. Namíchaná reakční směs (tab. 5) byla připipetovaná k 10 µl suspenze degradovaných bakteriální buněk. PCR reakce byla prováděna v termocykléru se stejným teplotním nastavením jako v případě klasické PCR reakce.

Tab. 5: Složení reakční směsi pro amplifikaci SSU rDNA.

Sterilní miliQ H_2O	4,1 µl
PCR pufr	2 µl
$MgCl_2$	1,5 µl
dNTP	1 µl
primer SP6	5 pmol
primer T7	5 pmol
Taq polymeráza	0,2 µl
BSA	0,2 µl

3.6.4. Izolace a přečištění plazmidů

Od každého kmene bylo vybráno několik bílých kolonií (rozlišení transformovaných bakterií je založeno na jejich rezistenci k ampicilinu a na modro-bílé selekci). Tyto kolonie byly přeneseny do zkumavky se 4ml média LB s 4µl ampicilinu (zásobní roztok 100 $\mu l.ml^{-1}$)

a vloženy přes noc do třepačky (37 °C, 220 rpm). Izolace plazmidů byla provedena kitem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) podle postupu „Plasmid DNA isolation and purification protocols“. Výsledná koncentrace DNA byla zjištěna na nanodropu, do sekvenační reakce bylo dáváno 500 ng vzorku.

3.7. Sekvenace DNA

Vlastní sekvenační reakce byla provedena Laboratoří sekvenace DNA (automatický DNA sekvenátor ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems)). Do laboratoře byly předávány vzorky o objemu 14 μl (180 ng DNA v případě PCR produktu, 500 ng DNA v případě vektoru; 3,2 pmol primeru; voda doplněná do 14 ul).

K sekvenaci byly použity primery 1055F (GGTGGTGCATGGCCG), 1055R (CGGCC-ATGCACCACC), 665R (ATACWCTAAGCGTCCTG) a 514F (GTGCCAGCMGCCGC-GG). V rámci klonování byly použity primery SP6 (GATTTAGGTGACACTATAG) a T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) komplementární k vektoru.

3.8. Vyhodnocení sekvencí a jejich analýza

Sekvence byly skládány z jednotlivých částí v programu SeqMan (součást programového balíku DNASTAR), z každé sekvence byly odstraněny sekvence primerů.

Alignment byl vytvořen metodou MAFFT (Katoh *et al*., 2002) pomocí internetového serveru http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/. Byl vybrán algoritmus G-INS-i, ostatní parametry zůstaly nezměněny. Výsledný alignment byl upraven ručně v programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999). Z alignmentu byly odstraněny hypervariabilní oblasti. Začátek a konec alignmentu byl ořezán tak, že všechny sekvence začínaly a končily ve stejné pozici. Výsledná délka alignmentu byla 1237 bp. Celkově byly vytvořeny dva datasety. V první analýze bylo použito 107 OTU (obr. 13), ve druhé analýze (102 OTU; obr 14) bylo vyřazeno 5 OTU (*Cochlosoma anatis*, *Staurojoenina assimilis*, *Hexamastix mitis*, *H. kirbyi*, *H. coercens*) vytvářející dlouhé větve. Druhý dataset byl vytvořen z prvního již ořezaného datasetu odstraněním výše uvedených 5 OTU. Do analýzy jsme zařadili všech našich 9 sekvencí volně žijících trichomonád a další publikované sekvence volně žijících trichomonád. Kromě těchto sekvencí jsme do analýzy zařadili reprezentanty všech hlavních linií skupiny Parabasalia.

Fylogenetické stromy byly konstruovány metodou maximum likelihood a Bayesovskou metodou. Analýza maximum likelihood byla provedena v programu RaxML 7.2.6

(Stamatakis, 2006) s modelem GTRGAMMAI. V programu RAxML byla provedena i bootstrapová analýza s 1000 replikáty. Ze získaných bootstrapových stromů byl v programu Consense programového balíku Phylip 3.69 (Felsenstein, 1989) vytvořen konsensuální strom, v jehož uzlech byly číselné hodnoty bootstrapu. Bayesovská analýza byla provedena v programu MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck a Ronquist, 2001) s modelem GTR + I + Γ + covarion. Počet generací Monte Carlo Markov Chain byl u obou datasetů 3.10^6 (průměrná odchylka obou souběžně probíhajících běhů byla menší než 1 % v posledních 75 % generací). Topologie stromů byla zaznamenávána každou 100. generaci. Prvních 7500 stromů bylo odstraněno jako „burnin“. Konsenzus zbylých stromů byl použit jako nejlepší topologie. Program MrBayes spočítal Bayesovské posteriorní pravděpodobnosti jednotlivých větví.

4. Výsledky

4.1. Původ izolovaných linií a výsledky kultivací

Celkově jsme získali devět izolátů (tab. 6) volně žijících trichomonád. Dva jsou z České republiky, pět z Řecka a dva z Kypru (LA – *Lacusteria cypriaca*, LIVADIAN – *Pseudotrichomonas keilini*) (obr. 12). V článku, který je součástí této diplomové práce, jsme publikovali též sekvenci druhu *Pseudotrichomonas keilini*, původem z mangrovového sedimentu na ostrově Ishigaki v Japonsku, kterou získal Dr. N. Yubuki. Izolát GOU23 získal V. Céza, izolát VAV1A1 prof. J. Vávra, izolát CK Mgr. L. Faltejsek, ostatní izoláty získal Dr. F. Šťáhlavský.

Tab. 6: Přehled získaných izolátů

Izolát	Lokalita	Souřadnice	Poznámka k habitatu
LA + LIVADIAN	Voroklini (Kypr)	34°58´N, 33°39´E	neznámá salinita
LAGOS2M + LAGOS2D	Porto Lagos (pevninské Řecko)	41°00´N, 25°06´E	neznámá salinita
E2NT	delta řeky Evros (pevninské Řecko)	40°48´N, 26°01´E	brakická voda
GR8	Thermopyly (pevninské Řecko)	38°47´N, 22°31´E	sirný pramen
VAV1A1	Nižbor (ČR)	50°00´N, 14°00´E	odpadní jímka
CK	Ústaleč (ČR)	49°19´N, 13°29´E	výtok uranového dolu
GOU23	Gouves (Kréta)	35°19´N, 25°18´E	vysychající koryto řeky

Izoláty LIVADIAN a LAI pocházely z jednoho sběru, byly ale od počátku kultivovány nezávisle. V obou případech byly 2 ml vzorku inokulovány do média ATCC #802, kultury byly přeočkovávány jednou týdně. Po několika málo pasážích docházelo k postupnému odumírání kultur, tyto kultury proto byly přeočkovány do média podle Dobell-Leidlaw. Izolát LIVADIAN se podařilo v tomto médiu stabilizovat, nicméně kromě trichomonád se v této kultuře vyskytovaly trepomonády a nálevníci. Po cca 20 pasážích došlo v jedné ze zkumavek k odumření trepomonád a nálevníků, čímž vznikla monoeukaryotická kultura, pojmenovaná LIVADIANT. Izolát LA se podařilo stabilizovat až v médiu sestávajícího z 1,5 ml koagulovaného koňského séra přelitého 10 ml média ATCC #802. V médiu se kromě trichomonád vyskytovaly trepomonády a neidentifikovaná améba. Po několika pasážích, kdy

bylo přeočkováváno médium pouze ze sloupce, došlo k vymizení trepomonád a améby, a vznikla monoeukaryotická kultura LAI.

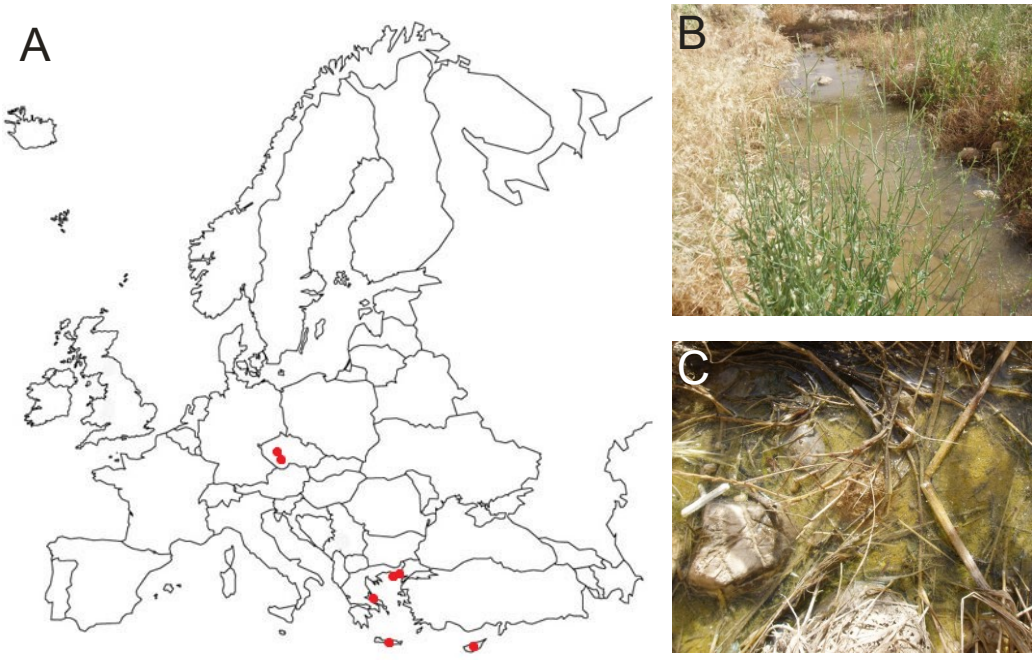
Izolát LAGOS2 byl inokulován do média ATCC #802 a do média Dobell-Leidlaw. V obou médiích vyrostly jiné trichomonády, v médiu ATCC #802 kmen LAGOS2M, v Dobell-Leidlaw kmen LAGOS2D. V obou případech jde o monoeukaryotické kultury (kmen LAGOS2M ovšem zanikl po zhruba 50 pasážích).

Izolát E2NT se podařilo ihned stabilizovat v médiu Dobell-Leidlaw. Jde o monoeukaryotickou kulturu.

Izolát GR8 vyrostl jak na médiu ATCC #802, tak na Dobell-Leidlaw, nicméně pouze v Dobell-Leidlaw šlo o monoeukaryotickou kulturu. Obě kultury zanikly po cca 30 pasážích.

Izolát VAV1A1 ze staré odpadní jímky se podařilo stabilizovat na médiu ATCC #802 i na médiu Dobell-Leidlaw. V tomto případě však nejde o monoeukaryotickou kulturu, neboť se spolu vyskytují dva druhy trichomonád (*Tetratrichomonas prowazeki* a *Honigbergiella* sp.).

Izoláty CK a GOU23 se nepodařilo stabilizovat. CK, izolovaný z výtoku uranového dolu, v žádném médiu vůbec nevyrostl, po několik dní přežíval v zásobní lahvi (5 l). GOU23 vyrostl na Dobell-Leidlaw, ale po 5 pasážích zanikl.



Obr. 12: A: místa nálezů našich izolátů: Každý nález je označen červeným puntíkem. Izoláty LAGOS2M, LAGOS2D (pevninské Řecko) a LAI, LIVADIAN (Kypr) byly vyizolovány společně. **B, C**: Fotografie habitatu izolátu GOU23 (letovisko Gouves, Kréta).

4.2. Fylogenetická analýza

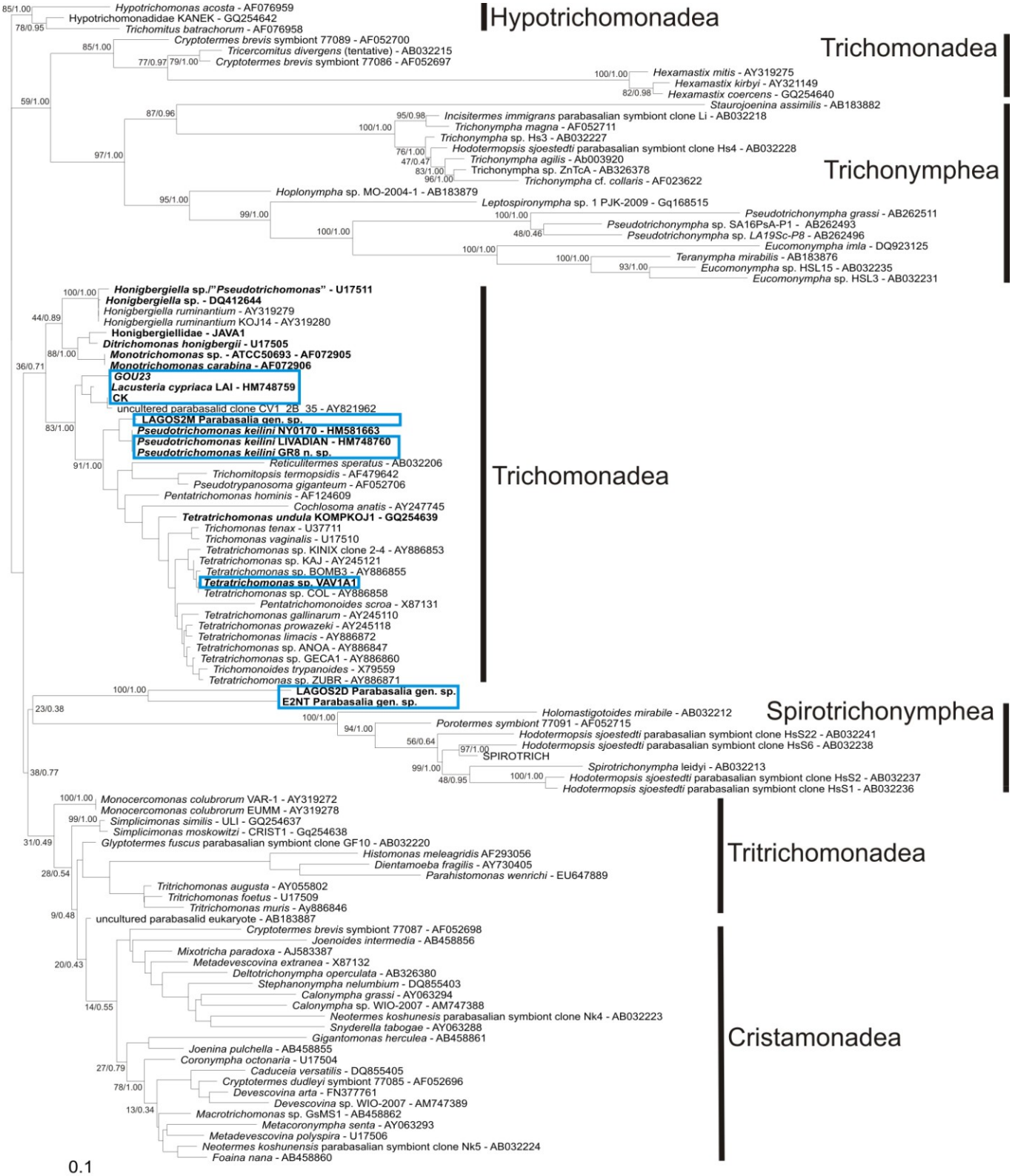
4.2.1. Přehled získaných sekvencí

Ze všech izolátů se nám podařilo získat sekvenci genu pro SSU rRNA, nicméně v případě izolátu VAV1A1 se nám ze dvou přítomných trichomonád podařilo doposud získat pouze sekvenci z početnější *Tetratrichomonas prowazeki*. SSU rDNA izolátu VAV1A1 jsme zaklonovali za účelem získání sekvence i méně početné trichomonády morfologicky připomínající rod *Honigbergiella*. Všech 50 osekvenovaných klonů však obsahovalo SSU rDNA druhu *T. prowazeki*. Ze sekvencí SSU rDNA jsme provedli fylogenetické analýzy (viz kap. 4.2.2).

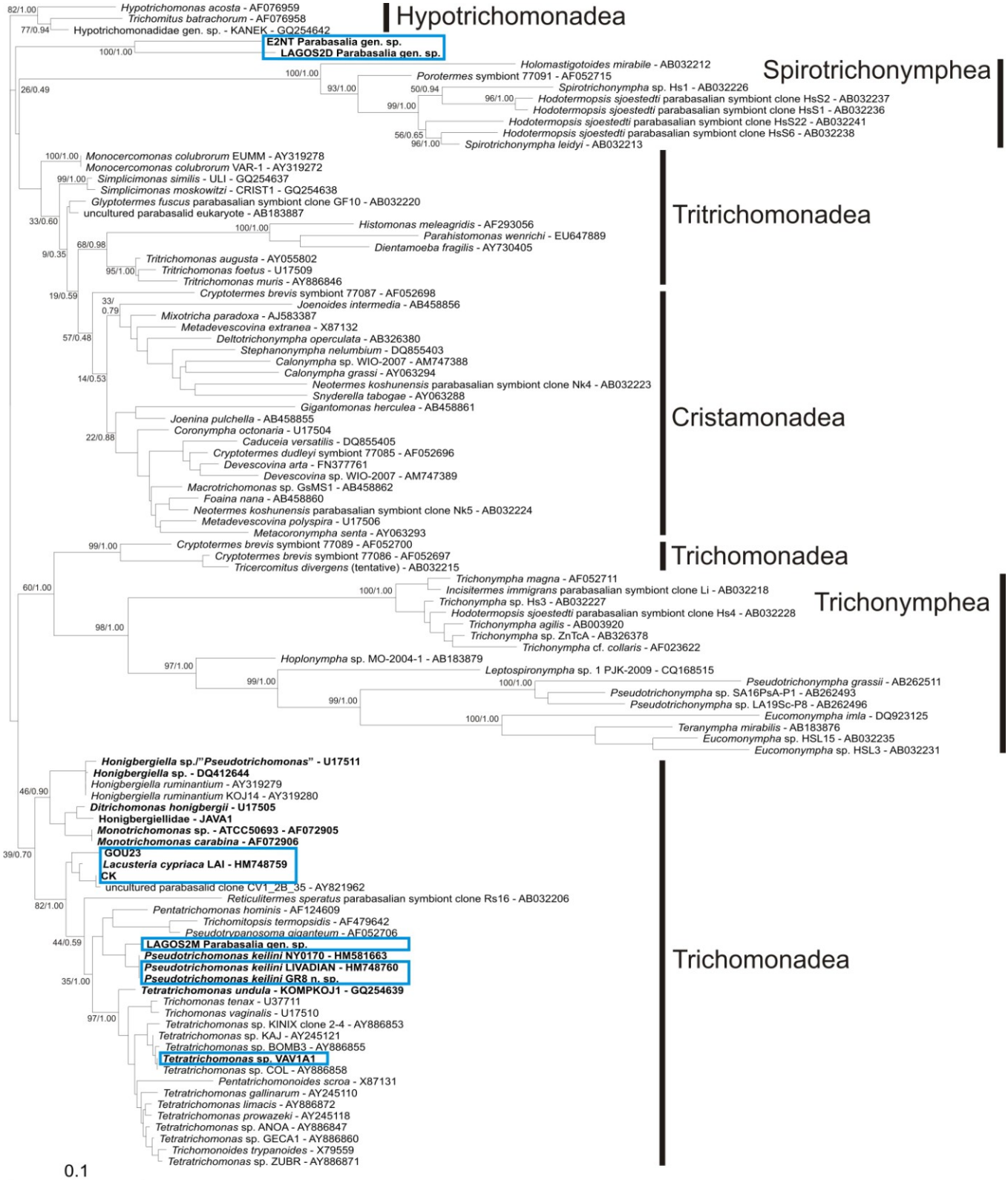
4.2.2. Výsledek fylogenetické analýzy

Byly provedeny dvě analýzy SSU rDNA. V první analýze bylo použito 107 OTU (obr. 13), ve druhé analýze (102 OTU; obr. 14) bylo vyřazeno 5 OTU (*Cochlosoma anatis*, *Staurojoenina assimilis*, *Hexamastix mitis*, *H. kirbyi*, *H. coercens*) vytvářející dlouhé větve. Obě analýzy vycházely z 1237 nukleotidových pozic (stromy nejsou zakořeněné). Do analýzy jsme zařadili všech našich 9 sekvencí volně žijících trichomonád a další publikované sekvence volně žijících trichomonád. Kromě těchto sekvencí jsme do analýzy zařadili reprezentanty všech hlavních linií skupiny Parabasalia. Většina OTU v naší analýze byla použita i v práci Cepicka *et al*., 2010.

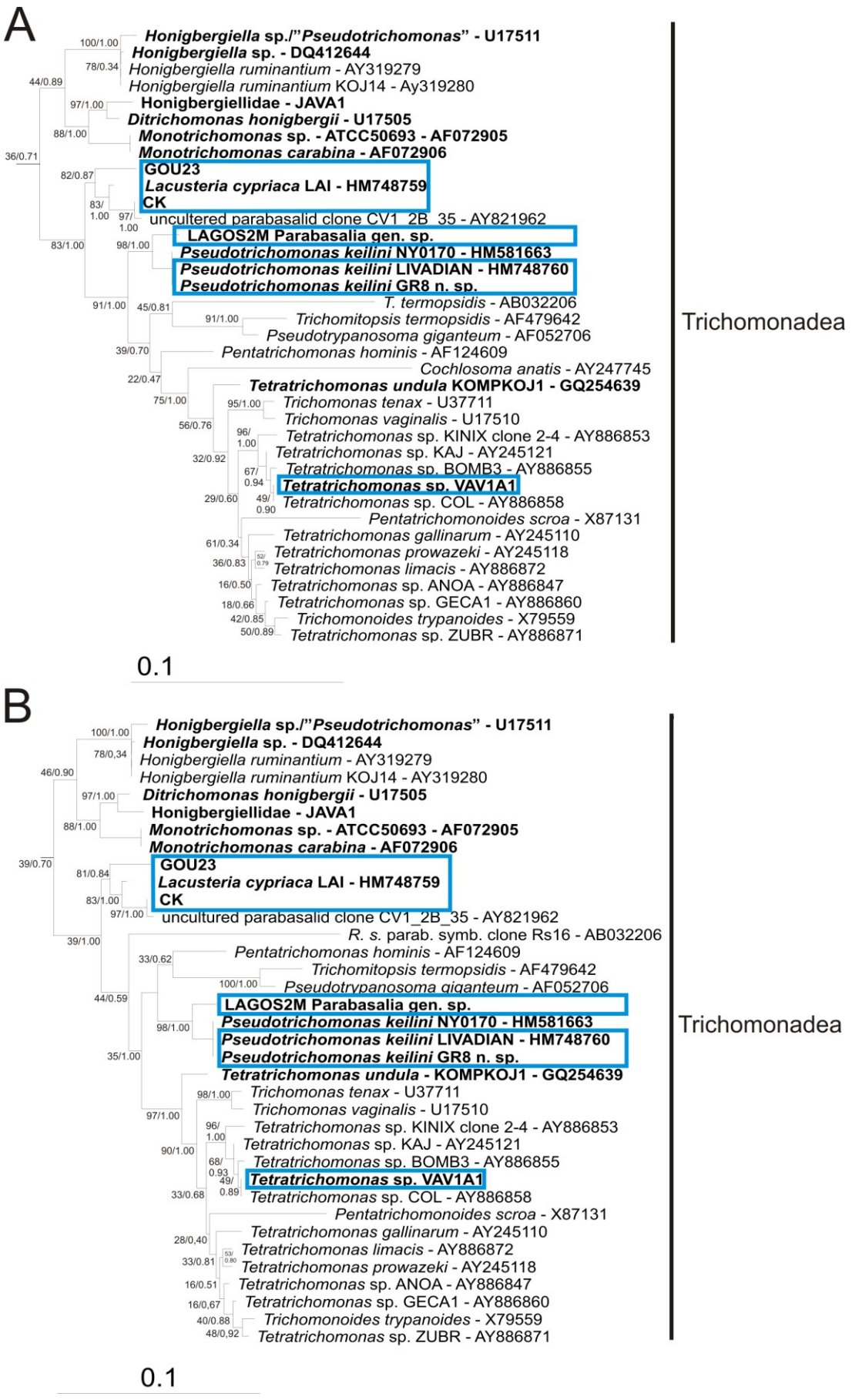
Výsledek obou analýz je ve shodě se studií Cepicka *et al*., 2010. Skupina Hypotrichomonadea získala v obou případech vysokou podporu (bootstrap (BS) 82 a 85, Bayesian posterior probability (BPP) v obou případech 1.00). Výborně podpořené byly také skupiny Spirotrichonymphea (BS 100, BPP 1) a Trichonymphea (BS 97, 98, BPP 1). Třída Cristamonadea byla monofyletická, ale s nízkou podporou (v analýze s dlouhými větvemi BS 20, BPP 0.43; v analýze bez dlouhých větví BS 57 BPP 0.48). Třídy Tritrichomonadea a Trichomonadea byly parafyletické: třída Tritrichomonadea obsahovala jako vnitřní větev třídu Cristamonadea, třída Trichomonadea zase třídu Trichonymphea. V souladu s předchozími studiemi (např. Cepicka *et al*., 2010; Dacks a Redfield, 1998; Delgado-Viscogliosi *et al*., 2000; Gerbod *et al*., 2004; Hampl *et al*., 2004, 2006, 2007; Ohkuma *et al*., 2007; Yubuki *et al*., 2010) nebyly vztahy mezi jednotlivými třídami statisticky příliš podpořeny.



Obr. 13: Fylogenetický strom skupiny Parabasalia založený na SSU rDNA. Strom byl konstruován metodou maximum likelihood v programu RaxML. Čísla v uzlech znamenají hodnotu bootstrapu z analýzy maximum likelihood/posteior probability z Bayesovské analýzy. Do analýzy bylo zahrnuto 107 OTU. Volně žijící trichomonády jsou zvýrazněny tučně, naše kmeny volně žijících trichomonád jsou ohraničeny modrým rámečkem. Strom není zakořeněný.



Obr. 14: Fylogenetický strom skupiny Parabasalia založený na SSU rDNA. Strom byl konstruován metodou maximum likelihood v programu v programu RaxML. Čísla v uzlech znamenají hodnotu bootstrapu z analýzy maximum likelihood/posteior probability z Bayesovské analýzy. Oproti předchozí analýze do této analýzy nebyl zařazen druh *Cochlosoma anatis* a další čtyři OTU, vytvářející dlouhé větve. Volně žijící trichomonády jsou zvýrazněny tučně, naše kmeny volně žijících trichomonád jsou ohraničeny modrým rámečkem. Strom není zakořeněný.



Obr. 15: Výřezy stromů z předchozích analýz. A: Výřez z 1. analýzy (obr. 13). B: Výřez z 2. analýzy (str. 14).

Kmeny E2NT a LAGOS2D tvoří samostatnou vysoce podpořenou linii (BS 100, BPP 1.00), která se nedá zařadit do žádné ze šesti existujících tříd. Určitou afinitu jevily v první analýze ke skupině Spirotrichonymphea, nicméně statistická podpora byla velmi nízká (BS 23, BPP 0.38).

S výjimkou kmenů E2NT a LAGOS2D patří všechny ostatní kmeny volně žijících trichomonád mezi Trichomonadea. Z toho důvodu byl přidán i obr. 15 s výřezy fylogenetického stromu trichomonadeí z obou analýz, uzly na výřezech jsou kompletně doplněné hodnotami BS/BPP.

V případě první analýzy (obr. 13, 15A), ve které je zahrnuta i *Cochlosoma anatis* a další linie s dlouhými větvemi, tvoří ostatní nově získané volně žijící trichomonády tři parafyletické linie; 1) Honigbergiellidae (BS 36, BPP 0.71), 2) *Lacusteria cypriaca*, GOU23 a CK (BS 83, BPP 1.00), 3) *Pseudotrichomonas keilini*, GR8 a LAGOS2M (BS 91, BPP 1.00). V analýze bez *C. anatis* (obr. 14, 15B) se linie *Pseudotrichomonas keilini* – GR8 – LAGOS2M odvětvuje na bázi *Pentatrichomonas* group čeledi Trichomonadidae (viz Yubuki *et al*., 2010). Izolát LAGOS2M je s *Pseudotrichomonas keilini* sesterský (BS 98, PP 1.00).

Kmen VAV1A1 byl v obou analýzách nejpříbuznější *Tetratrichomonas* sp. BOMB3 (BS 49, PP 0.89 a 0.90).

4.3. Morfologie nových izolátů

Do stabilní kultury se nám podařilo převést izoláty LAI (*Lacusteria cypriaca*), LIVADIAN (*Pseudotrichomonas keilini*), LAGOS2M, LAGOS2D, E2NT, GR8 a VAV1A1. Všechny tyto kmeny jsme nabarvili protargolem. Izoláty CK a GOU23 se nepodařilo převést do stabilní kultury, proto z nich žádná morfologická data nemáme. Kmen GR8 přežil pouze 30 pasáží, kmen LAGOS2M asi 50 pasáží. Pro úplnost je zde uvedena i morfometrika *P. keilini* z Japonska, kterou zpracoval Naoji Yubuki. Kmeny E2NT a LAGOS2D jsme připravili pro transmisní elektronovou mikroskopii a v současné době jsme začali studovat jejich ultrastrukturu.

Morfologická analýza většiny kmenů volně žijících trichomonád stále probíhá, z toho důvodu jsou v této diplomové práci uvedeny pouze částečné morfologické popisy. Výjimku tvoří již publikovaný izolát LA druhu *Lacusteria cypriaca* a LIVADIAN druhu *Pseudotrichomonas keilini*.

Tab. 7: **Distribuce hlavních morfologických znaků u našich izolátů**

Rod	Afl	UM	C	FpRFl
Lacusteria cypriaca	3	+	-	+
LAGOS2M	4	+	-	-
LAGOS2D	2	-	-	+
E2NT	3	-	-	+
GR8	3	+	-	-
VAV1A1 *T. prowazeki*	4	+	+	+
VAV1A1 *Honigbergiella*	3	-	-	+

Afl – počet předních bičíků, UM – undulující membrána, C – kosta, FpRfl – volný konec zpětného bičíku. Ve všech případech je axostyl typu *Trichomonas*.

Tab. 8: **Rozměry jednotlivých izolátů nabarvených protargolem**

Izolát	Délka buňky	Šířka buňky	Délka buňky/šířka buňky	Volná část axostylu
E2NT	6,7 ± 0,7 (5,1-7,9)	4,9 ± 0,6 (3,7-6,4)	1,4 ± 0,1 (1,2-1,7)	3,1 ± 0,4 (2,3-4,2)
GR8	6,8 ± 1 (5,8-8,2)	5 ± 0,3 (3,9-5,6)	1,3 ± 0,1 (1,2-1,5)	2,9 ± 0,5 (2-4,1)
VAV1A1 - *Tetratrichomonas*	9,4 ± 1,2 (7,8-12,4)	6,2 ± 0,9 (3,6-8,7)	1,5 ± 0,1 (1,3-1,8)	3,4 ± 0,8 (2,1-5,5)
VAV1A1 - *Honigbergiella*	6,8 ± 0,9 (4,6-8,2)	5 ± 0,7 (3,6-6,4)	1,4 ± 0,1 (1,1-1,6)	2,5 ± 0,5 (1,6-3,9)
LAGOS2M	9,8 ± 2,2 (6,4-15,4)	5,4 ± 1,2 (3,9-8,6)	1,8 ± 0,2 (1,4-2,7)	2,6 ± 0,9 (1-5)
Lacusteria cypriaca	4,3 ± 0,6 (3-5,4)	2,9 ± 0,3 (2,1-3,7)	1,5 ± 0,2 (1,2-2)	1,9 ± 0,6 (1,1-3,3)
Pseudotrichomonas keilini LIVADIAN	5,6 ± 0,7 (4,3-7)	3,9 ± 0,3 (3,1-4,6)	1,4 ± 0,2 (1,2-1,8)	1,9 ± 0,5 (1,1-3,5)
LAGOS2D	5 ± 0,6 (4,1-5,9)	3,4 ± 0,4 (2,7-4,2)	1,5± 0,1 (1,2-1,8	3,1 ± 0,6 (1,8-4,1)

Rozměry v μm, n = 30.

Tab. 9: **Rozměry živých buněk *L. cypriaca* a *P. keilini* LIVADIAN a NY0170 (Yubuki *et al*., 2010)**

Izolát	Délka buňky	Šířka buňky	Volný konec axostylu
Lacusteria cypriaca LA	8,0 (5-10,7)	5,5 (3,6-7,6)	4,9 (3,1-6,7)
Pseudotrichomonas keilini NY0170	10,7 (8,5-13,7)	7,8 (5,3-9,9)	7,1 (4,1-11,9)
Pseudotrichomonas keilini LIVADIAN	9,4 (8,2-10,5)	7,1 (6,1-8,3)	5,8 (4,9-7)

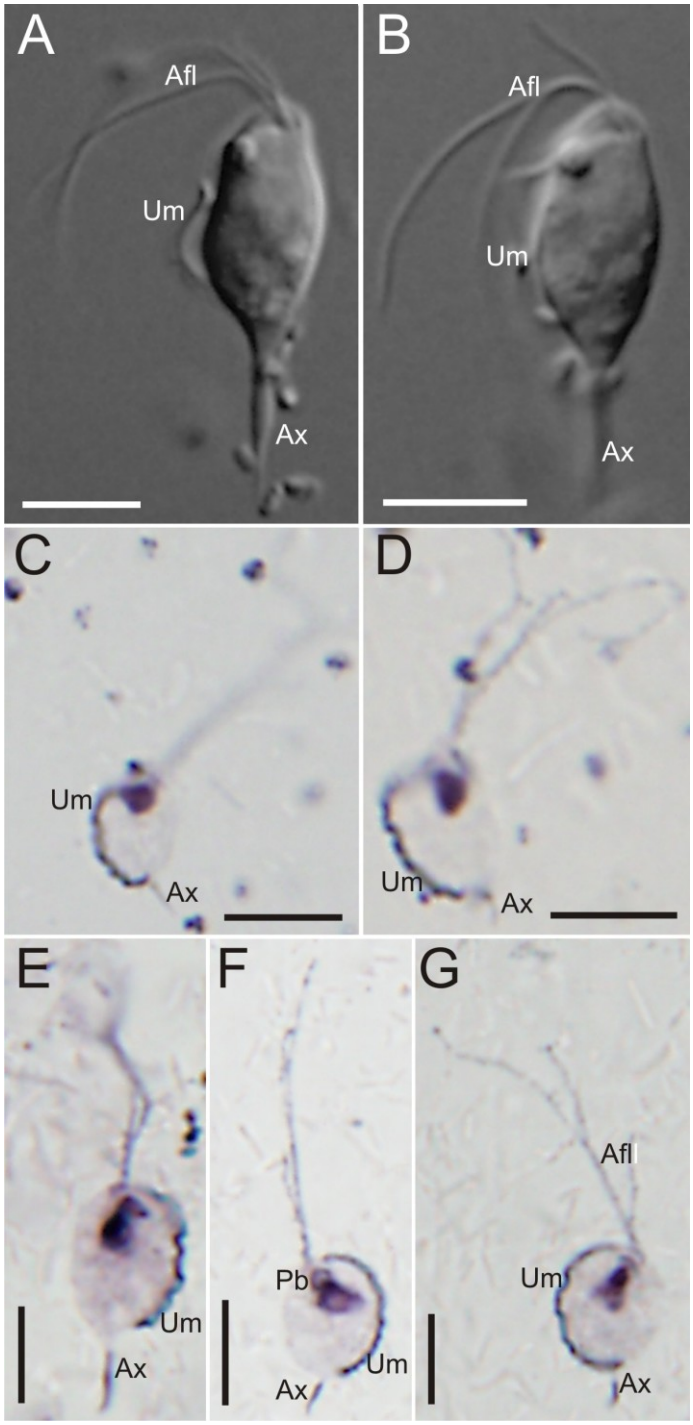
Rozměry v μm, n = 20. Izolát *P. keilini* z Japonska měřil N. Yubuki.

4.3.1. *Pseudotrichomonas keilini*

Kmen LIVADIAN

Živé buňky izolátu LIVADIAN (obr. 16A, B) měří v průměru 9,4 (8,2-10,5) μm na délku a 7,1 (6,1-8,3) μm na šířku. Průměrná délka vyčnívající části axostylu je 5,8 (4,9-7) μm. Průměrná délka buněk nabarvených protargolem (obr. 16C, D) je 5,6 ± 0,7 (4,3-7) μm, průměrná šířka 3,9 ± 0,3 (3,1-4,6) μm a průměrná délka vyčnívajícího axostylu je 1,9 ± 0,5

(1,1-3,5) µm. Morfologie odpovídá původnímu popisu *Pseudotrichomonas keilini* (Bishop, 1935). Buňky mají tři nestejnocenné přední bičíky, zpětný bičík vytváří dobře vyvinutou undulující membránu lameliformního typu. Undulující membrána vytváří několik vln a většinou dosahuje až ke konci těla. Volný konec zpětného bičíku není přítomen, kosta chybí. Některé buňky obsahují pouze dva přední bičíky. Pelta je normálně vyvinutá, axostyl je typu *Trichomonas*. Parabazální aparát je diskovitý.



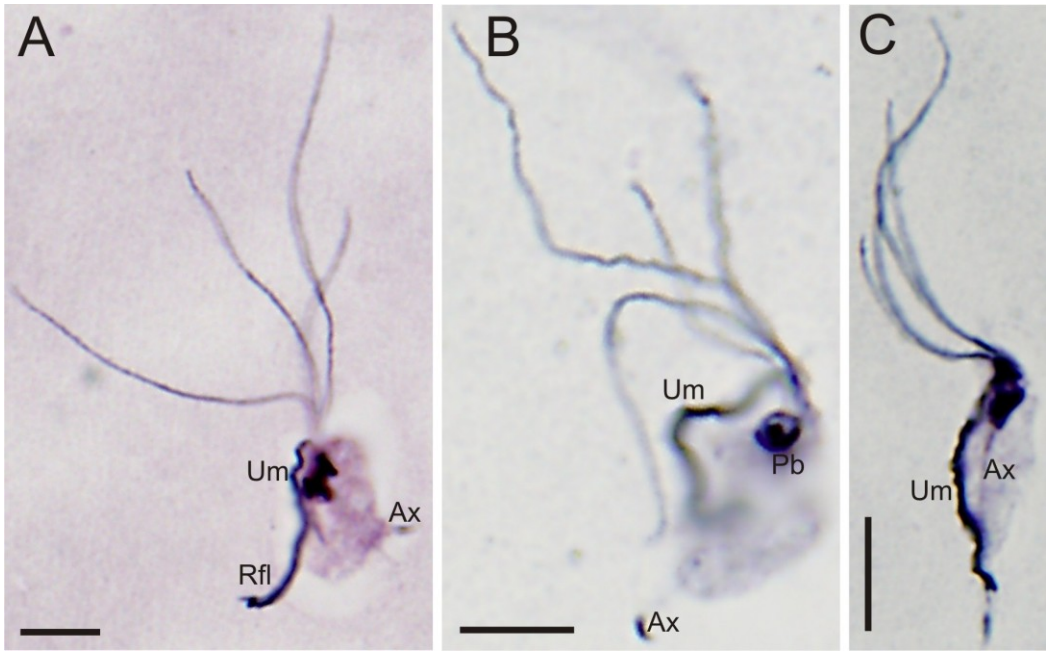
Obr. 16: Fotografie izolátů *Pseudotrichomonas keilini* LIVADIAN (A-D) a GR8 (E-G). A-B: nativ, C-G: protargol. Afl – přední bičíky, Ax – axostyl, Pb – parabazální aparát, Um – undulující membrána. Měřítko 5 µm.

Kmen GR8

GR8 (obr. 16E – G) je morfologicky prakticky identický s kmenem LIVADIAN. Průměrná délka buněk nabarvených protargolem je 6,8 ± 1 (5,8-8,2) µm, průměrná šířka 5 ± 0,3 (3,9-5,6) µm a průměrná délka vyčnívajícího axostylu je 2,9 ± 0,5 (2-4,1) µm.

4.3.2. Kmen LAGOS2M

Průměrná délka buněk nabarvených protargolem (obr. 17) je 9,8 ± 2,2 (6,4-15,4) µm, průměrná šířka 5,4 ± 1,2 (3,9-8,6) µm a průměrná délka vyčnívajícího axostylu je 2,9 ± 0,9 (1-5) µm. Buňky mají čtyři nestejnocenné přední bičíky, vyvinutou undulující membránu s několika záhyby, kosta chybí. U buněk není přítomný volný konec zpětného bičíku. Pelta je normálně vyvinutá. Axostyl je typu *Trichomonas*, parabazální aparát je velký a diskovitý s rozsáhlou centrální granulí (obr. 17B).

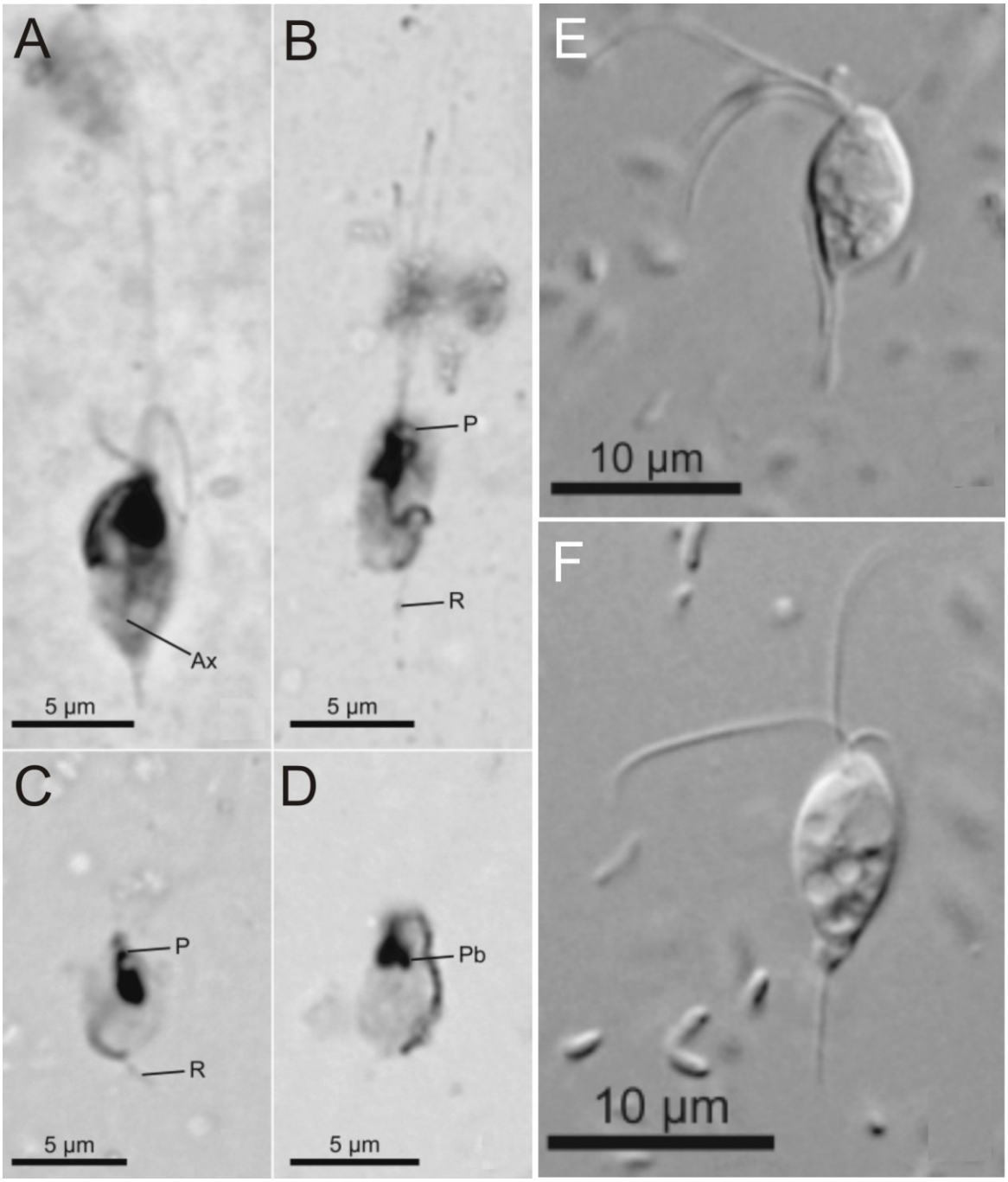


Obr. 17: Fotografie kmenu LAGOS2M nabarveného protargolem. Ax – axostyl, Rfl – zpětný bičík, Um – undulující membrána. Měřítko 5 µm.

4.3.3. *Lacusteria cypriaca*

Živé buňky kmene LA měří v průměru 8 (5-10,7) µm na délku a 5,5 (3,6-7,6) µm na šířku. Průměrná délka vyčnívající části axostylu je 4,9 µm (3,1-6,7). Průměrná délka buněk nabarvených protargolem je 4,3 ± 0,6 (3-5,4) µm, průměrná šířka 2,9 ± 0,3 (2,1-3,7) µm a průměrná délka vyčnívajícího axostylu je 1,9 ± 0,6 (1,1-3,3) µm. Tento druh má tři nestejnocenné přední bičíky, zpětný bičík vytváří slabě vyvinutou undulující membránu

proměnlivé délky. Tato membrána má obvykle pouze jednu nebo dvě vlny. U buněk je obvykle přítomný volný konec zpětného bičíku, v některých případech však nebyl detekován. Kosta není přítomna, parabazální aparát je malý diskovitý, pelta je normálně vyvinutá.

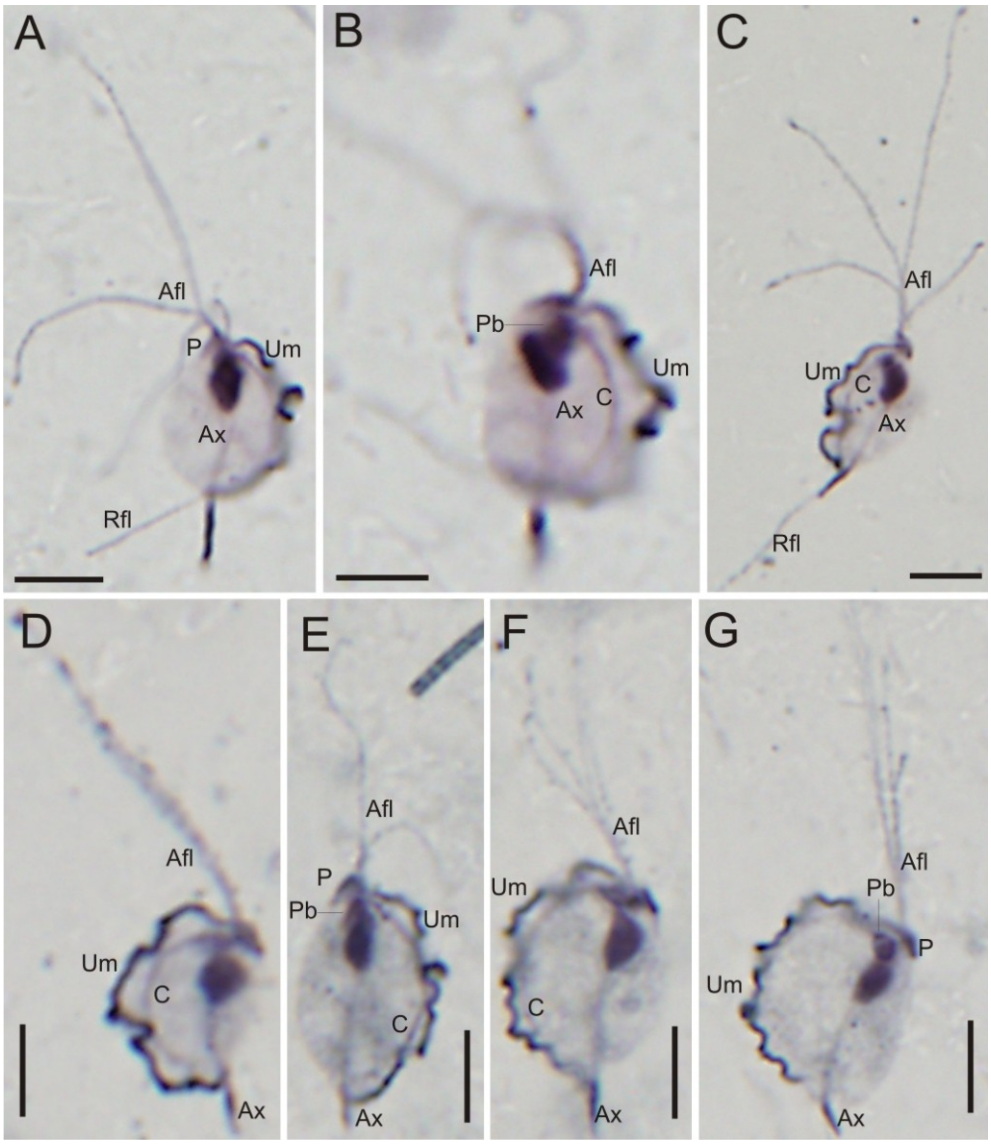


Obr. 18: Fotografie *Lacusteria cypriaca*: A-D: Buňky barvené protargolem, E,F: Živé buňky. Ax – axostyl, P – pelta, Pb – parabazální aparát, R – zpětný bičík. Převzato z Yubuki *et al*., 2010.

4.3.4. Izolát VAV1A1

Tetratrichomonas sp.

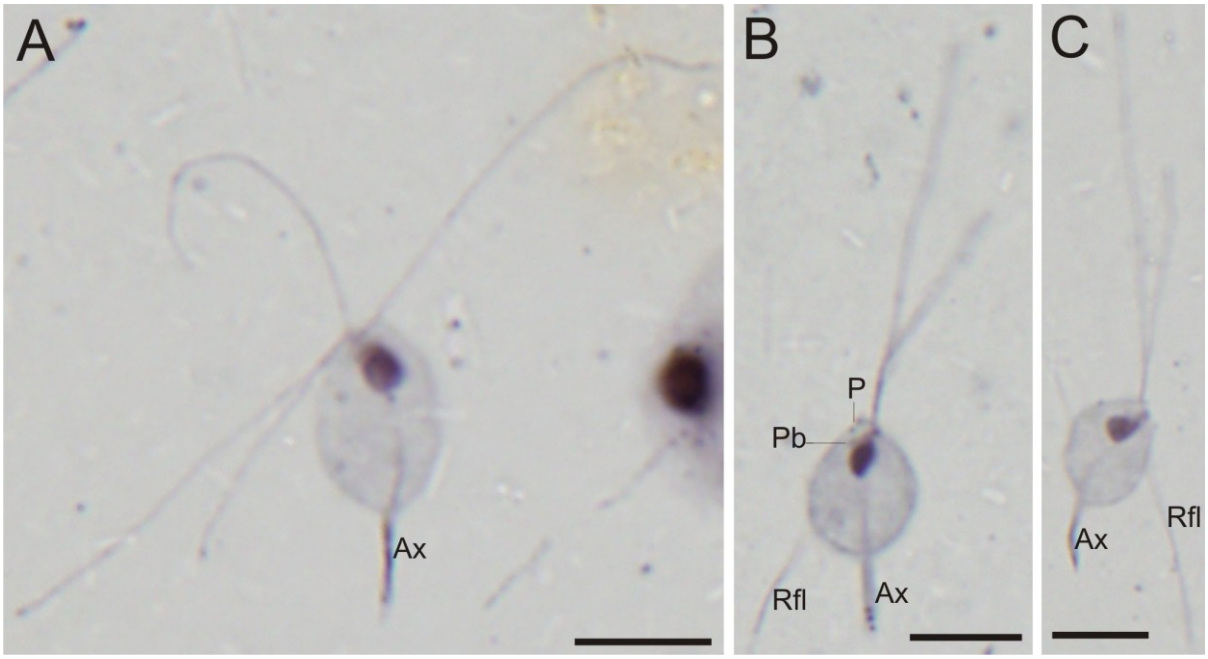
Průměrná délka buněk nabarvených protargolem je 9,4 ± 1,2 (7,8-12,4) µm, průměrná šířka 6,2 ± 0,9 (3,6-8,7) µm a průměrná délka vyčnívajícího axostylu je 3,4 ± 0,8 (2,1-5,5) µm. Buňky jsou sekvenčně i morfologicky identické s druhem *Tetratrichomonas prowazeki* (Alexeieff) Alexeieff, 1911 (morfologie *T. prowazeki* viz. Honigberg, 1951). Má čtyři nestejnocenné přední bičíky zakončené „knobs“, zpětný bičík vytváří hodně spirální undulující membránu, která dosahuje do konce buňky. Volný konec zpětného bičíku je přítomen a měří přibližně 5 µm. Kosta je přítomná, pelta je normálně vyvinutá. Parabazální aparát je velký, diskovitý s centrální granulí.



Obr. 19: Fotografie izolátu VAV1A1 nabarveného protargolem (A – C). Pro srovnání jsou zde také fotografie tří buněk z kultury *Tetratrichomonas prowazeki* (**PYX**), které dokládají morfologickou shodu mezi naším izolátem a *Tetratrichomonas prowazeki* (D – G). Kultura PYX byla zapůjčena Ivanem Čepičkou. Měřítko 5µm.

Honigbergiella sp.

Průměrná délka buněk nabarvených protargolem je 6,8 ± 0,9 (4,6-8,2) µm, průměrná šířka 5 ± 0,7 (3,6-6,4) µm a průměrná délka vyčnívajícího axostylu je 2,5 ± 0,5 (1,6-3,9) µm. Trofozoiti jsou morfologicky velmi podobní druhu *Honigbergiella ruminantium*. Mají tři nestejnocenné přední bičíky, v některých případech dva (viz obr. 20b-c). Undulující membrána ani kosta nejsou přítomny. Pelta je malá (obr. 20B). Odlišností oproti *H. ruminantium* je délka předních bičíků (bičíky jsou delší o více jak 50%, přesnější údaj bude znám po dokončení probíhající morfologické analýzy).



Obr. 20: Fotografie trichomonády připomínající rod *Honigbergiella* (A – C). Ax – axostyl, P – pelta, Pb – parabazální aparát, Rfl – zpětný bičík. Měřítko 5µm.

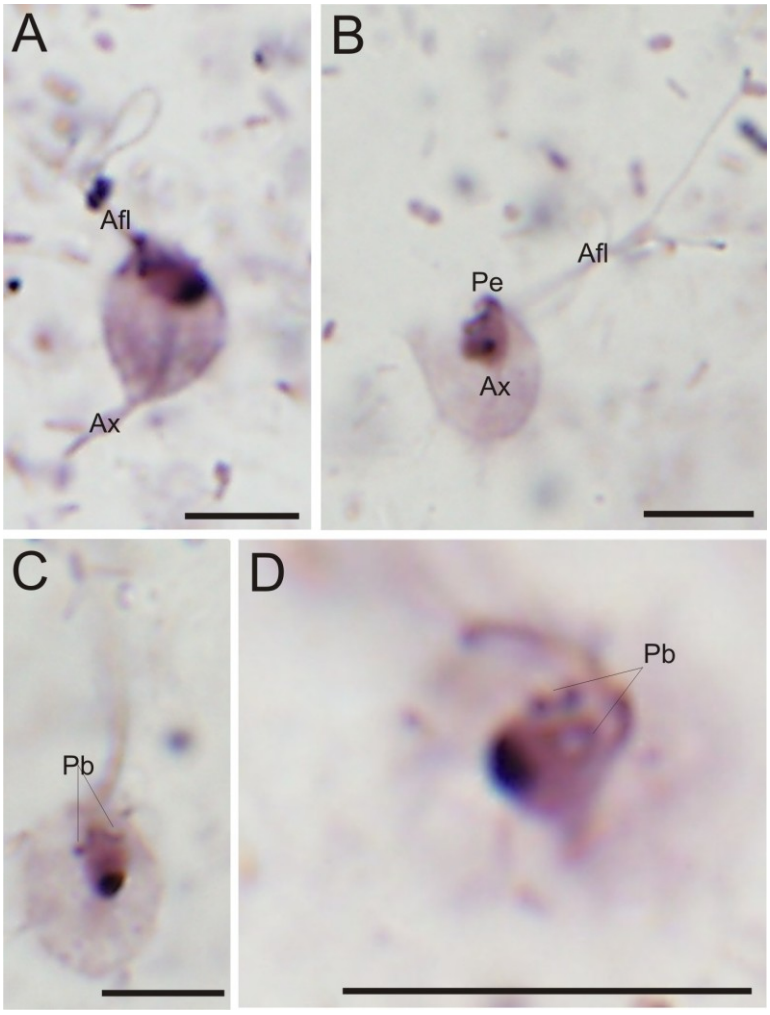
Kromě *Tetratrichomonas* sp. a *Honigbergiella* sp. byly v izolátu VAV1A1 nalezeny také oxymonády, enteromonády a *Rhizomastix*,

4.3.5. Kmen E2NT

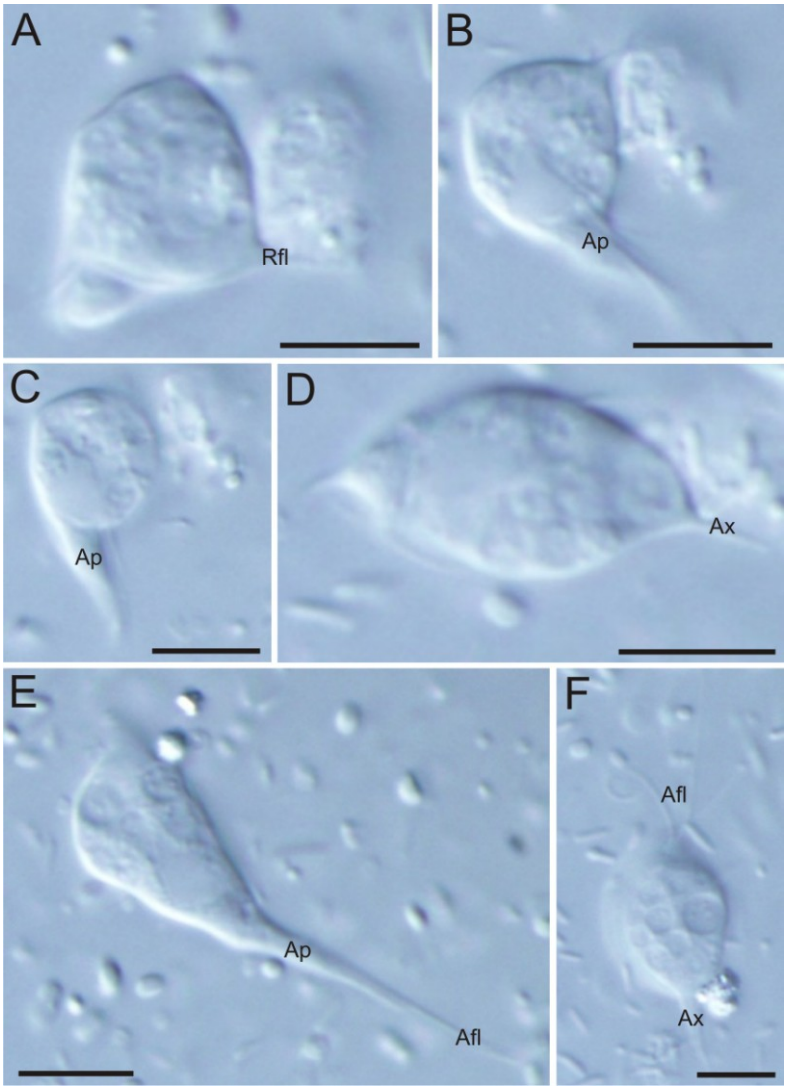
Průměrná délka buněk nabarvených protargolem je 6,7 ± 0,7 (5,1-7,9) µm, průměrná šířka 4,9 ± 0,6 (3,7-6,4) µm a průměrná délka vyčnívajícího axostylu je 3,1 ± 0,4 (2,3-4,2) µm. Buňky mají tři nestejnocenné přední bičíky zakončené „knobs“ (obr. 21B), chybí jim undulující membrána a kosta. Pelta je normálně vyvinutá (obr. 21B). Parabazální aparát je dvouramenný, jednotlivá ramena mají formu kroužků (obr. 21C, D).

Živé buňky jsou pleomorfní, často protáhlé (obr. 22E), a jejich přední část je neobvykle pohyblivá. Spolu s předními bičíky vytváří unikátní styl pohybu. Na obr. 22A – D je zachycena sekvence pohybu přední části buňky s bičíky, která je axostylem fixována k podkladu (fotografie sekvence pohybu celých buněk nefixovaných k podkladu není možné z technických důvodů pořídit). U buněk nabarvených protargolem (obr. 21) nezůstala přední pohyblivá část zachována.

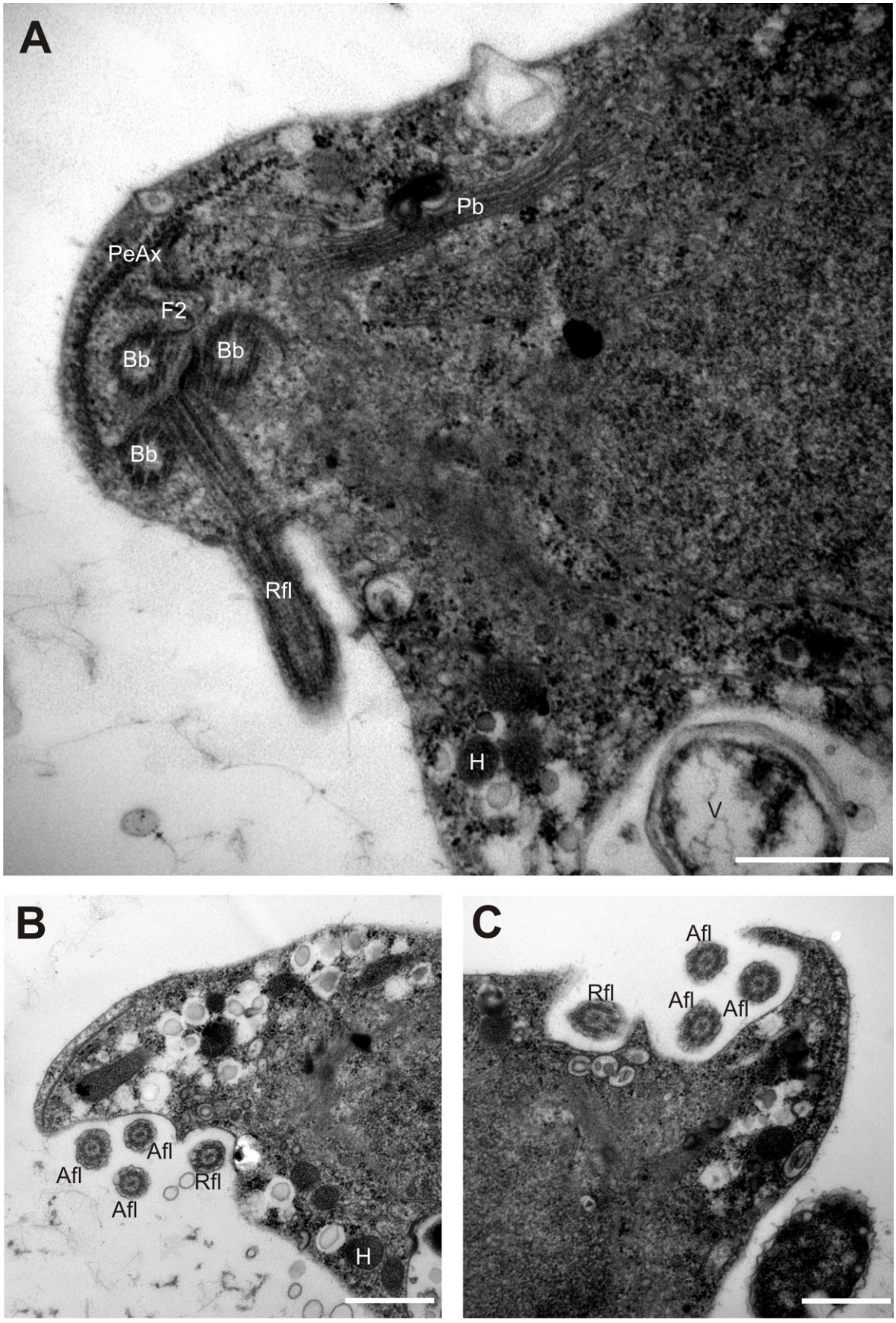
Studium ultrastruktury (obr. 23) dosud neodhalilo nic netypického. Buňky mají čtyři bazální tělíska, pelta i hydrogenozomy jsou klasické. Zpětný bičík pravděpodobně nijak neadheruje. Chybí žíhané fibrily (pravděpodobně vinou fixace).



Obr. 21: Fotografie kmenu E2NT nabarveného protargolem (A – D). Afl – přední bičíky, Ax – axostyl, Pe – pelta, Pb – parabazální aparát. Měřítko 5 μm.



Obr. 22: Fotografie živých buněk kmenu E2NT. A – D: sekvence pohybu jedné konkrétní buňky, je v něm zachyceno jedno máchnutí přední pohyblivé části buňky s bičíky. E: Velmi protažená buňka, axostylem je přichycená k podkladu. F: Nepohyblivá buňka. Měřítko 5μm.

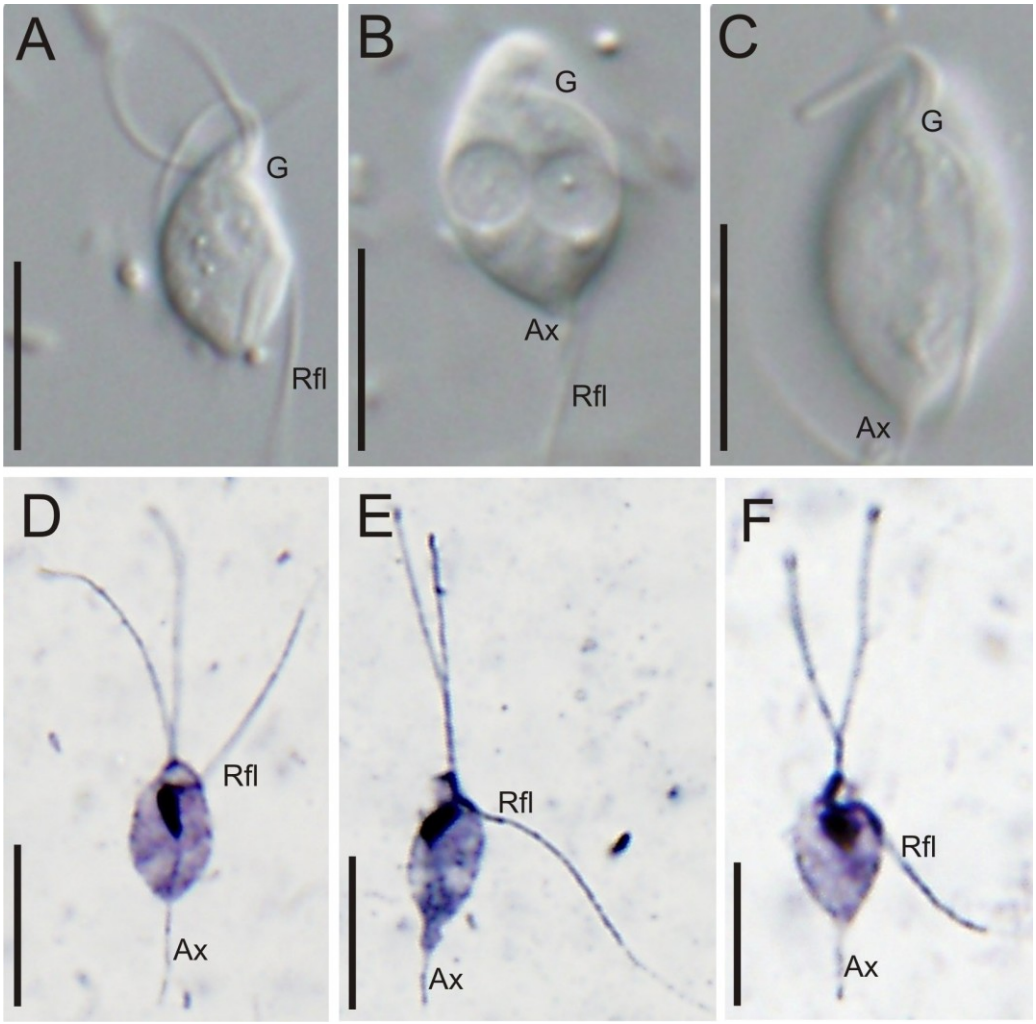


Obr. 23: Ultrastruktura kmenu E2NT. Afl – přední bičík, Bp – bazální tělísko, F2 – sigmoidální lamela, H – hydrogenozom, Pb – parabazální aparát, PeAx – pelto-axostylární spojení, Rfl – zpětný bičík. Měřítko 500 nm.

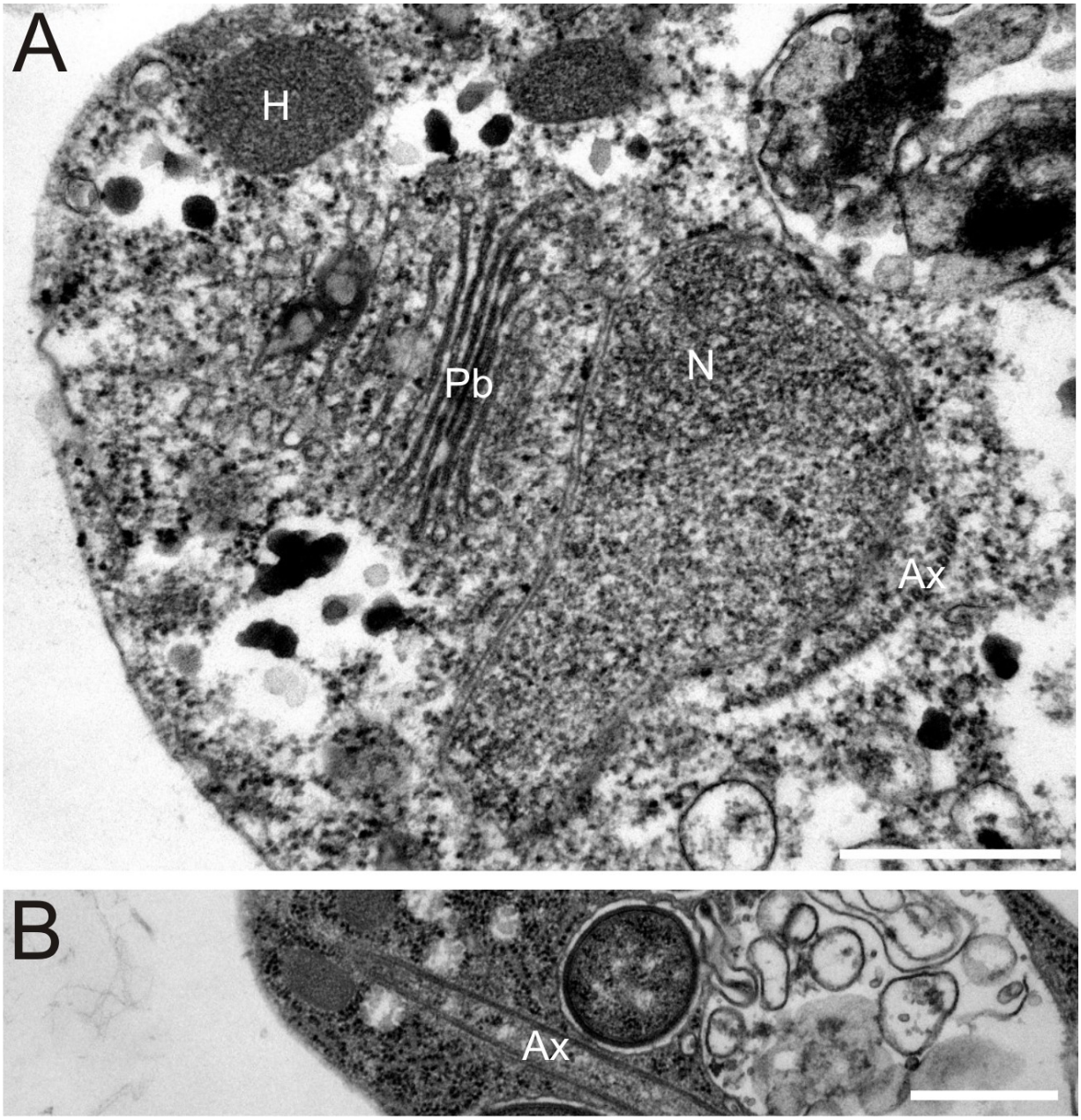
4.3.6. Kmen LAGOS2D

Průměrná délka buněk nabarvených protargolem je 5 ± 0,6 (4,1-5,9) µm, průměrná šířka 3,4 ± 0,4 (2,7-4,2) µm a průměrná délka vyčnívajícího axostylu je 3,1 ± 0,6 (1,8-4,1) µm. Buňky mají pouze dva (nestejnocenné) přední bičíky zakončené „knobs“, chybí jim undulující membrána a kosta. Axostyl je tenký. Pelta je normálně vyvinutá. Parabazální aparát nebyl pozorován.

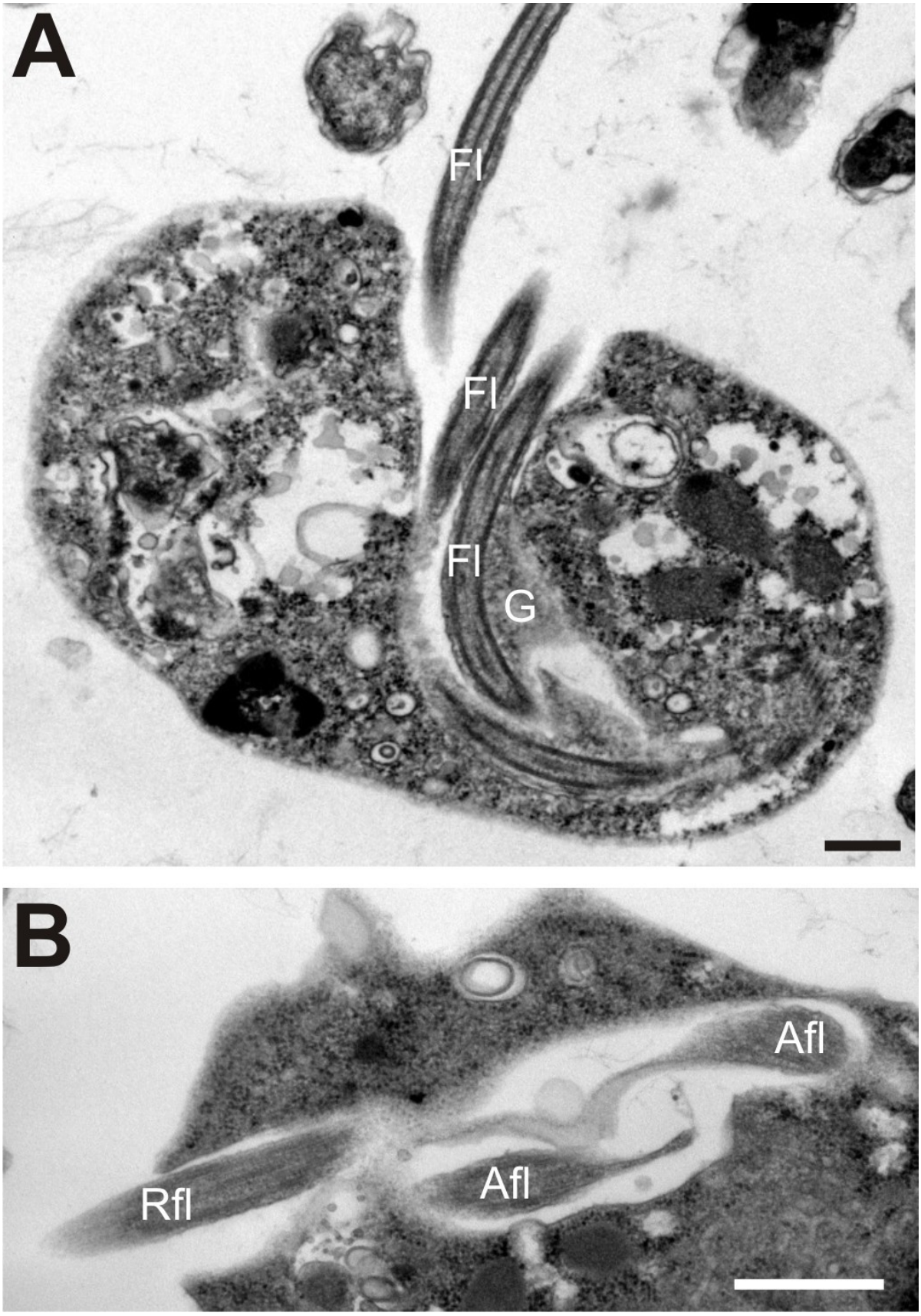
Buňky mají hlubokou kapsu (obr. 26A), ze které vychází bičíky. Kapsa je částečně patrná i na nativních preparátech (obr. 24A – C). Přední bičíky a zpětné bičíky mají pravděpodobně dvě nezávislá vyústění, která ústí do té kapsy. Patrně všechny bičíky jsou opatřeny ploutvičkami, nicméně tyto ploutvičky nejsou pozorovány u všech bičíků najednou (obr. 27). Ve většině případů si nejsme jistí, který z bičíků je zpětný. Zpětný bičík pravděpodobně vůbec neadheruje. Na pořízených fotografiích chybí žíhané fibrily.



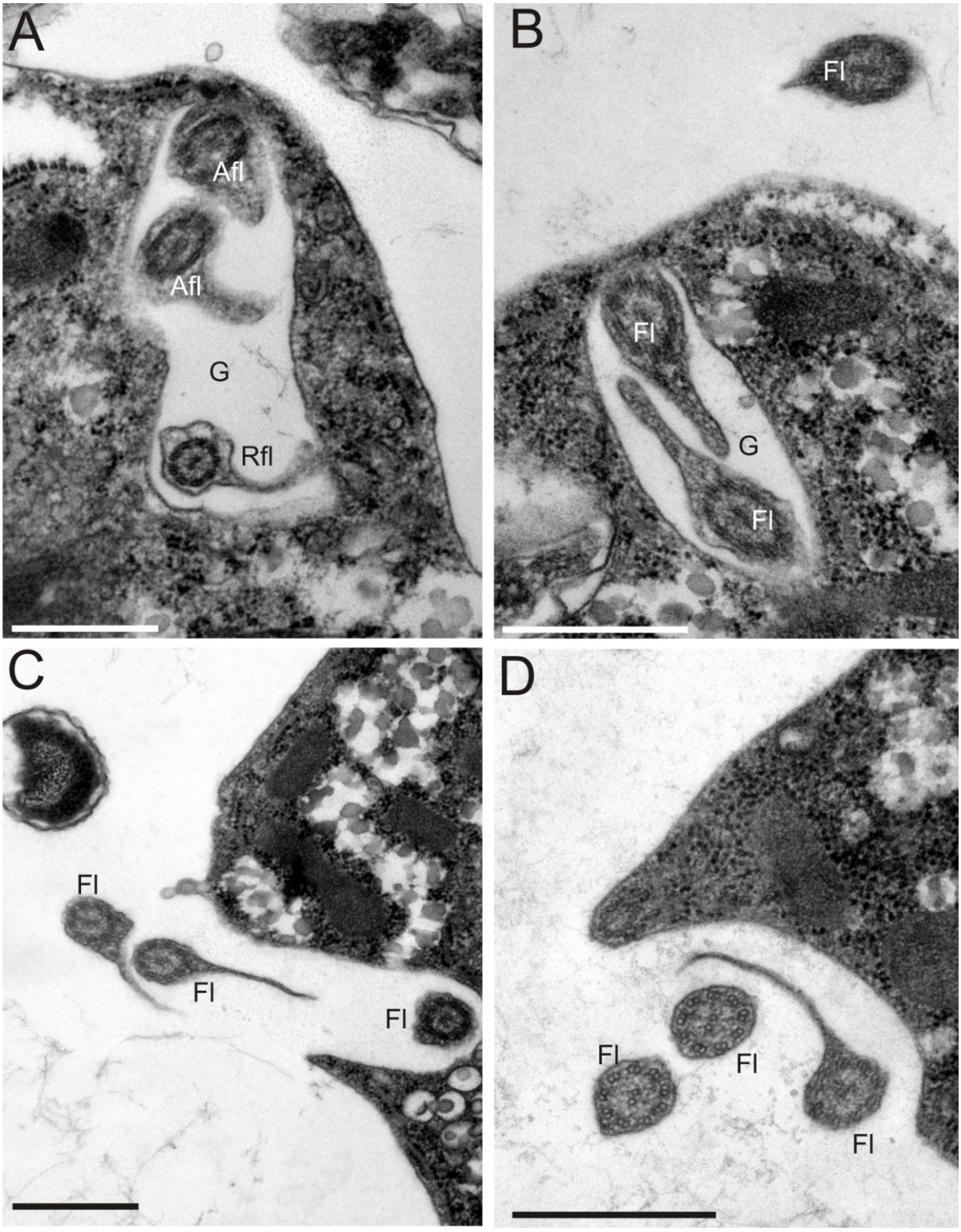
Obr. 24: Fotografie živých buněk kmenu LAGOS2D (A – C) a buněk nabarvených protargolem (D – F). Ax – axostyl, G – kapsa, ze které vychází bičíky, Rfl – zpětný bičík. Měřítko 5 µm.



Obr. 25: Ultrastruktura kmenu LAGOS2D. Ax – axostyl, H – hydrogenozom, N – jádro, Pb – parabazální aparát. Měřítko 500 nm.



Obr. 26: Ultrastruktura kmenu LAGOS2D. Afl – přední bičík, Fl – bičík, G – kapsa, ze které vychází bičíky, Rfl – zpětný bičík. Měřítko 500 nm.



Obr. 27: Ultrastruktura kmenu LAGOS2D. Afl – přední bičík, Fl – bičík, G – kapsa, ze které vychází bičíky, Rfl – zpětný bičík. Měřítko 500 nm.

5. Diskuze

5.1. Získávání nových izolátů a sekvencí

Cílem této práce bylo získat co nejvíce izolátů volně žijících trichomonád, tyto izoláty převést do stabilní kultury, nabarvit protargolem a získat z nich sekvenci genu pro SSU rRNA, což je nejpoužívanější gen pro fylogenetické analýzy skupiny Parabasalia.

Ke kultivaci bylo používáno médium podle Dobell-Leidlaw, Sonnebornovo parameciové médium (ATCC #802), médium sestávající s koagulovaného koňského séra přelitého 10 ml ATCC 802 a médium Dobell-Leidlaw se 3 ml ATCC #802. Z celkových devíti izolátů volně žijících trichomonád se nám jich sedm podařilo převést do kultury. Vůbec se nepodařilo se stabilizovat izolát CK, získaný z výtoku uranového dolu v Ustaleči (ČR). Tyto trichomonády přežívaly pouhých pět dní v zásobní lahvi, přičemž v žádném médiu nevyrostly. Druhý izolát, který se nepodařilo stabilizovat, byl GOU23 z letoviska Gouves (Kréta). Izolát vyrostl na médiu podle Dobell-Leidlaw, ve kterém přežíval pouhé tři pasáže. Ze 6 izolátů se podařilo vytvořit monoeukaryotické kultury (LIVADIANT, LAI, LAGOS2M, LAGOS2D, E2NT, GR8), v kultuře VAV1A1 žijí dvě trichomonády (*Tetratrichomonas prowazeki*, *Honigbergiella* sp.). Izoláty GR8 a LAGOS2M uhynuly, ostatní se podařilo zamrazit. Je zajímavé, že s výjimkou LAGOS2M a LAI všechny stabilní kultury rostou na médiu podle Dobell-Leidlaw, VAVA1 prospívá v Dobell-Leidlaw i v ATCC #802. Může to být dané tím, že volně žijící trichomonády jsou euryvalentní. Jiným vysvětlením může být to, že mají jako sekundárně volně žijící stále schopnost prospívat a vyrovnávat se s prostředím trávicího traktu.

Všechny stabilizované kultury jsme nabarvili protargolem, což je nejdůležitější metoda srovnávací morfologie trichomonád. Použili jsme protargol od firmy Bayer, se kterým máme dobré zkušenosti. Po nabarvení protargolem zůstává zachována prostorová struktura buněk a je možné pozorovat vzájemné uspořádání organel. Ideálně se obarví bičíky a jejich bazální tělíska, kosta, axostyl, pelta, parabazální aparát a jádro. Tato metoda je však časově poměrně náročná, navíc se nedá zcela optimalizovat. Každý preparát je nutné barvit na více sklíčkách současně, v některých případech se musí barvit opakovaně. U několika izolátů se nám ani opakovaně nepodařilo nabarvit některé znaky. Předpokládáme, že za tím může být nějaká konkrétní vlastnost dané kultury. Na základě morfologie se nám již podařilo popsat nový druh a rod *Lacusteria cypriaca* (Yubuki *et al*., 2010). V případě dalších izolátů zhruba během

jednoho roku dokončíme započatou morfologickou analýzu a tyto druhy (v některých případech rody) připravíme k popisu.

Sekvenci genu pro SSU rRNA jsme získali ze všech devíti izolátů, nicméně v izolátu VAV1A1 byly přítomné dva druhy trichomonád, masivně rostoucí *Tetratrichomonas prowazeki* a menší trichomonáda, morfologicky připomínající rod *Honigbergiella*. Přistoupili jsme proto ke klonování SSU rDNA izolátu VAV1A1, nicméně dosud jsme získali pouze sekvence patřící druhu *T. prowazeki*.

5.2. Molekulárně-fylogenetická analýza

Výsledky obou našich fylogenetických analýz založených na genu pro SSU rRNA jsou ve shodě s analýzou Cepicka *et al*., 2010 a mnohými dalšími analýzami (např. Dacks a Redfield, 1998; Delgado-Viscogliosi *et al*., 2000; Gerbod *et al*., 2004; Hampl *et al*., 2004, 2006, 2007; Ohkuma *et al*., 2007; Yubuki *et al*., 2010). Vysoce podpořené byly skupiny Hypotrichomonadea, Spirotrichonymphea a Trichonymphea. Monofylie třídy Cristamonadea byla podpořena pouze slabě. Skupiny Tritrichomonadea a Trichomonadea byly parafyletické nebo polyfyletické.

Naše kmeny volně žijících trichomonád tvoří několik linií. Samostatnou vysoce podpořenou linii tvoří kmeny E2NT a LAGOS2D. Tuto linii nemůžeme s určitostí zařadit do žádné ze šesti ustanovených skupin parabazalidů. Určitou afinitu jevily v první analýze (107 OTU) ke skupině Spirotrichonymphea, nicméně statistická podpora byla velmi nízká.

Volně žijící kmen VAV1A1 je konspecifický s druhem *Tetratrichomonas prowazeki*. Tvoří jednu z koncových větví tetratrichomonád spolu s izolátem *Tetratrichomonas prowazeki* COL. Naproti tomu druhý volně žijící zástupce tetratrichomonád (*T. undula*) se s vysokou podporou odvětvuje na bázi *Trichomonas* group čeledi Trichomonadidae (rody *Trichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonoides*, *Trichomonoides*).

Většina fylogenetických stromů trichomonád je založena na sekvencích genu pro SSU rRNA. Na jeho základě jsme schopni rozlišit diverzitu eukaryotických linií jako jsou trichomonády, nicméně analýzy založené na sekvencích tohoto genu trpí fylogenetickými artefakty způsobenými přítomností četných linií s dlouhými větvemi (Hampl *et al*., 2004). V současné době nejen, že nevíme, kde leží kořen skupiny Parabasalia, ale nejsou jasné ani vztahy mezi hlavními liniemi. Na základě SSU rDNA nejsme schopni zjistit fylogenetickou pozici kmenů E2NT a LAGOS2D.

5.3. Identifikace nových rodů a druhů

Pseudotrichomonas keilini

Druh *Pseudotrichomonas keilini* (Bishop, 1935) byl vůbec první popsanou volně žijící trichomonádou, nicméně kultura, a tudíž i sekvenční data, od tohoto druhu neexistovala. Zjistilo se totiž, že kultura deponovaná v ATCC (katalogové číslo 50321), označená jako *P. keilini*, i z ní získaná sekvence SSU rDNA, patří ve skutečnosti do rodu *Honigbergiella* (Hampl *et al*., 2007). Na základě morfologie (tři přední bičíky, absence undulující membrány, kosty, infrakinetozomálního i komb-like tělíska) byl skutečný druh *P. keilini* v novém systému (Cepicka *et al*., 2010) zařazen do skupiny Honigbergiellida, blízko rodu *Honigbergiella*. V článku Yubuki *et al.* (2010) se nám podařilo publikovat vůbec první dvě sekvence SSU rDNA druhu *P. keilini* (kultury LIVADIAN z Kypru a NY0170 z Japonska; NY0170 izoloval Naoji Yubuki), díky nimž jsme zjistili, že *P. keilini* ve skutečnosti nepatří do skupiny Honigbergiellidae, ale že se větví uvnitř skupiny Trichomonadida. Na základě našich dat jsme *Pseudotrichomonas keilini* přesunuli ze skupiny Honigbergiellida do čeledi Trichomonadidae (řád Trichomonadida). Morfologické znaky *P. keilini* nicméně odpovídají skupině Honigbergiellidae, u tohoto druhu tedy došlo k paralelní redukci bičíků a ztrátě kosty.

Do druhu *Pseudotrichomonas keilini* evidentně patří i kmen GR8, který má s kmeny LIVADIAN a NY0170 velice podobnou morfologii i sekvenci SSU rDNA (viz kap. 4.3.1).

Kmen LAGOS2M

Izolát LAGOS2M je blízce příbuzný druhu *Pseudotrichomonas keilini*. Oproti *P. keilini* má čtyři přední bičíky (*P. keilini* má pouze tři). Po dokončení morfologické analýzy rozhodneme, zda bude LAGOS2M zařazen do rodu *Pseudotrichomonas*, nebo zda pro něj bude vytvořen nový rod. Hlavním znakem odlišujícím od sebe rody trichomonád patřících do tříd Hypotrichomonadea, Trichomonadea, Tritrichomonadea, je právě počet bičíků (Honigberg, 1963) a až na pár výjimek (např. *Tritrichomonas nonconforma*, viz Honigberg, 1963, nebo *Tetratrichomonas* sp., viz Cepicka *et al*., 2006) byl tento úzus dodržen.

Lacusteria cypriaca

Kmen LA byl na základě morfologie (tři nestejnocenné přední bičíky, zpětný bičík tvořící málo vyvinutou undulující membrány variabilní délky s jednou až dvěma vlnami, ve většině

případů přítomný volný konec zpětného bičíku, absence kosty, malý diskovitý parabazální aparát) a sekvenčních dat (na základě SSU rDNA tvoří samostatnou linii na bázi řádu Trichomonadida) popsán jako nový druh a rod *Lacusteria cypriaca* (Yubuki *et al.*, 2010). Podobnou sekvenci jako *Lacusteria cypriaca* mají izoláty CK a GOU23, od nich však nemáme žádná morfologická data (zanikly záhy po izolaci).

Izolát VAV1A1

V tomto případě jde o klasickou *Tetratrichomonas prowazeki*, která je endobiotická a její nález ve staré odpadní jímce je tudíž překvapivý (více viz. kap. 5.4.).

Honigbergiella sp.

Od tohoto izolátů nám doposud chybí sekvenční data. Na základě morfologie (tři nestejnocenné přední bičíky, absence undulující membrány a kosty, tenký axostyl, malá pelta a malý diskovitý parabazální aparát) jsme přesvědčeni, že patří do rodu *Honigbergiella*.

Kmen E2NT

Buňky izolátu E2NT mají neobvykle protaženou a pohyblivou přední část buňky se třemi předními bičíky, která vytváří unikátní styl pohybu (viz. kap. 4.3.5). Tyto buňky jsou často navíc protáhlé a celkově variabilní. Po nabarvení protargolem se ukázalo, že mají pozoruhodný parabazální aparát, ve tvaru dvou kroužků.

Kmen LAGOS2D

Buňky kmenu LAGOS2D má pouze dva přední bičíky. Buňky mají velkou kapsu na apikální části buňky, ze které vychází bičíky. Všechny tři bičíky (přední i zpětný) mají pravděpodobně ploutvičky. V několika málo případech jsme ploutvičky pozorovali na všech bičících současně, nicméně většinou pouze na jednom či na dvou bičících. Navíc ve většině případů nejsme schopni odlišit zpětný bičík od předních, což situaci značně komplikuje. V případě kapsy i bičíku by mohlo jít o exkavátní znaky (kapsa jako pozůstatek exkavátní rýhy, ploutvička na zpětném bičíku jako pozůstatek původní exkavátní ploutvičky), které u trichomonád nebyly dosud nalezeny, nicméně v současné době jsme teprve na začátku zkoumání ultrastruktury tohoto kmene a na nějaké další závěry budeme muset chvíli počkat.

V případě, že by se potvrdila bazální pozice izolátu LAGOS2D a výše uvedené dva znaky by byly shledány jako exkavátní, vyvstala by otázka, proč i přední bičíky jsou opatřeny ploutvičkami. V této chvíli jde o čistou spekulaci, ale dovedeme si představit, že tato trichomonáda žila po celou dobu v nějaké izolované lokalitě s nedostatkem potravy a postupem času si vytvořila ploutvičky i na předních bičících, které ještě více zefektivnily příjem potravy.

5.4. Fenomén sekundárního volně žijícího způsobu života

Jak již bylo zmíněno v přehledu literatury, volně žijící trichomonády jsou s velkou pravděpodobností sekundárně volně žijící (Delgado-Viscogliosi *et al*., 2000; Yubuki *et al*., 2010). Na základě fylogenetické pozice našich kmenů volně žijících trichomonád usuzujeme, že i ony jsou volně žijící sekundárně a jejich předkové byli endobiotičtí. Výjimku tvoří kmeny E2NT a LAGOS2D, jejichž fylogenetická pozice je nejasná a tyto kmeny by mohly být primárně volně žijící.

Schopnost těchto přeskoků mezi životem v trávicím traktu a volně žijícím způsobem života u volně žijících trichomonád možná ještě rozšiřuje situace v rodu *Honigbergiella*. Tento rod sestává ze dvou kongenerických druhů, *Honigbergiella ruminantium* a *Honigbergiella* sp. Oba druhy jsou morfologicky téměř identické a jejich sekvence genu pro SSU rRNA se odlišují pouze 27 nukleotidy (2 % divergence). Výrazně se však liší ve své ekologii, *Honigbergiella ruminantium* je střevní komenzál krav, kdežto *Honigbergiella* sp. je volně žijící (Hampl *et al*., 2007). Podle autorů je pravděpodobné, že druh *Honigbergiella ruminantium* v nedávné době přešel do endobiotického prostředí. Je však také možné, že jde ve skutečnosti o jeden a ten samý druh, který je schopen přežít v obou typech prostředí, nebo je endobiotický a sediment, ze kterého byl izolován *Honigbergiella* sp. byl kontaminován trusem skotu. K faktu, že by mohlo jít o dva samostatné druhy, existuje doposud jediná indicie, a sice že údajně volně žijící *Honigbergiella* sp. nepřežil pokusnou teplotu 37 °C (Hampl *et al*., 2007). K rozřešení tohoto problému by pomohl buď infekční pokus, spočívající v experimentální nákaze krávy organizmem *Honigbergiella* sp., nebo by pomohlo získání několika dalších izolátů rodu *Honigbergiella*. V případě, že by se získané izoláty rozpadly do dvou skupin, vznikla by dobrá podpora pro to, že jde o dva druhy (linie či genotypy). Pokud by byly izoláty na fylogenetickém stromu promíchané, stále by mohlo jít o dva druhy, nicméně oba by byly jak volně žijící, tak endobiotické.

Na základě dosavadních výsledků se otevírá otázka hranice mezi endobiotickým a volně žijícím způsobem života. Oním přechodem mezi oběma typy prostředí by mohly být odpadní jímky a podobná zařízení. Tato myšlenka vznikla na základě izolátu VAV1A1, který byl získán ze staré odpadní jímky ve vesnici Nižbor (ČR). V tomto izolátu se vyskytoval klasický endobiotický druh *Tetratrichomonas prowazeki,* který se do jímky dostal pravděpodobně z nějakého obojživelníka, nicméně musel v tomto prostředí nějakou dobu přežívat. Navíc jsme v této jímce nalezli trichomonádu s morfologickými znaky rodu *Honigbergiella*, který by mohl být (jak naznačuje předchozí odstavec) napůl endobiotický a napůl volně žijící. Kromě těchto dvou trichomonád zde byly nalezeny oxymonády, enteromonády a *Rhizomastix*, což jsou všechno endobiotické taxony nebo taxony sdružující endobiotické i volně žijící zástupce. Jsme přesvědčeni, že k zodpovězení otázky hranice mezi endobiotickým a volně žijícím způsobem života bude třeba systematické studium takovýchto zařízení.

5.5. Rozšíření volně žijících trichomonád

Naše znalosti o rozšíření volně žijících trichomonád jsou fragmentární. Existují ojedinělé nálezy z Evropy (Anglie, České republika), východní Asie, Austrálie a střední Ameriky. Co se týče našich vzorků, jde zatím pouze o náhodné vzorky, snad s výjimkou České republiky a Řecka. Dva z našich celkových devíti izolátů volně žijících trichomonád byly získány v České republice, další dva jsou z Kypru, čtyři z pevninského Řecka a jeden z Kréty. Na základě našich dosavadních výsledků se zdá, že diverzita a četnost výskytu volně žijících trichomonád stoupá od mírného pásu směrem k Mediteránu. Ve zhruba 150 vzorcích z České republiky, které má naše laboratoř k dispozici, byly volně žijící trichomonády zjištěny ve dvou případech, naproti tomu ze 30 vzorků z Řecka a Kypru byly přítomné v sedmi vzorcích. Mediterán z tohoto důvodu považujeme za nejbližší centrum diverzity volně žijících trichomonád. Vzorkované oblasti v Mediteránu jsou nicméně omezeny pouze na Řecko, Kypr a částečně Turecko, bude je třeba rozšířit i na další oblasti a posléze také na oblasti tropického pásu.

Mediterán je typický vysokou vlhkostí v zimě a velkým suchem v létě. Z toho důvodu je v letním období dostupné minimum potenciálních lokalit pro výskyt volně žijících trichomonád. Tyto lokality jsou rozmístěny mozaikovitě a často se nachází daleko od sebe. Např. na Krétě jsme v květnu 2010 podnikli týdenní exkurzi s cílem získat vzorky ze všech dostupných anoxických a mikrooxických sedimentů. Za celý týden byla nalezena pouze jedna vhodná lokalita, nicméně byla osídlena volně žijícími trichomonádami (izolát GOU23). To

ukazuje na schopnost volně žijících trichomonád přežívat nepříznivé podmínky a šířit se na vzdálené lokality. Pravděpodobně je to způsobeno tvorbou odolných cyst. U volně žijících druhů *Ditrichomonas honigbergii* a *Honigbergiella* sp. byla prokázána tvorba pravých cyst s buněčnou stěnou, internalizovanými bičíky a granulovanou cytoplazmou (Farmer *et al*., 1995; Hampl *et al*., 2007), nicméně v našich izolátech jsme žádné cysty doposud nedetekovali. Problematice cyst bude třeba v budoucnu věnovat zvýšenou pozornost.

Za zmínku stojí izoláty LIVADIAN a NY0170 (Yubuki *et al.*, 2010). Oba izoláty patří druhu *Pseudotrichomonas keilini*, nicméně byly získány z velmi odlišných lokalit. Izolát LIVADIAN byl získán z jezera neznámé salinity ležícího na Kypru (jezero nebylo přímo spojeno s mořem). Naproti tomu izolát NY0170 (izoloval Naoji Yubuki) byl získán ze sedimentu mangrovů na ostrově Ishigaki. Do druhu *P. keilini* patří také náš izolát GR8, který byl získán ze sirného pramene v Thermopylách. Všechny tyto nálezy ukazují na širokou ekologickou valenci druhu *P. keilini*.

Nárůst objevených druhů volně žijících trichomonád v poslední době (do roku 1999 byly popsány dva druhy, od té doby čtyři druhy, tři druhy v současné době připravujeme k popisu) ukazuje na to, že jejich reálná diverzita bude o mnoho větší, než se předpokládalo. Tyto druhy navíc tvoří samostatné fylogenetické linie. Bude třeba pokračovat ve studiu volně žijících trichomonád, neboť to povede nejen k zvýšení našich znalostí o jejich diverzitě a rozšíření, ale jistě také přispěje k lepšímu pochopení evoluce skupiny Parabasalia jako celku a možná také k pochopení evoluce v raných stádiích vývoje této skupiny.

6. Závěrečné shrnutí

1. Na základě našich současných výsledků se zdá, že diverzita volně žijících trichomonád stoupá od severu k jihu. Za nejbližší centrum diverzity považujeme Mediterán. Jelikož je výskyt vhodných lokalit v Mediteránu přes léto nízký, předpokládáme, že velkou roli v šíření a překonávání nepříznivých podmínek budou hrát cysty. Tvorba cyst byla nicméně prokázána pouze u dvou druhů volně žijících trichomonád, u našich kmenů se nám ji zatím nepodařilo prokázat. Doposud jsme získali devět izolátů volně žijících trichomonád, nicméně vzorkované oblasti jsou omezené na Českou republiku, Řecko a Kypr. Do budoucna bude třeba rozšířit počet zkoumaných lokalit a vzorkování provádět pokud možno systematicky.

2. Dosud bylo popsáno šest druhů volně žijících trichomonád, z toho jeden druh jsme popsali my. Kromě toho jsme získali osm izolátů volně žijících trichomonád, tvořících šest druhů a pět až šest rodů, z toho tři druhy a dva až tři rody jsou nové (přesný počet nových rodů bude záležet na tom, jestli LAGOS2M zařadíme do rodu *Pseudotrichomonas* nebo pro něj vytvoříme nový rod). Všechny tyto rody a druhy připravujeme k popisu. Volně žijící trichomonády jsou tak podstatně více diverzifikované, než se myslelo.

3. Ze všech devíti izolátů jsme získali sekvenci genu pro SSU rRNA, v tomto a v následujícím roce chceme získat sekvence dalších genů, jako jsou aktin, alfa a beta tubulin. Sedm izolátů jsme nabarvili protargolem. Pět izolátů jsme převedli do stabilní kultury a paralelně zamrazili. Též jsme začali zkoumat ultrastrukturu kmenů E2NT a LAGOS2D.

4. Kmeny E2NT a LAGOS2D vytvářejí na SSU rDNA stromu samostatnou linii, kterou není možné zařadit do žádné ze šesti skupin trichomonád. Kromě toho mají oba unikátní morfologii. E2NT má vyvinutou neobvykle protaženou a pohyblivou přední část buňky, jeho parabazální aparát má tvar dvojice kroužků. LAGOS2D má hlubokou kapsu na apikální části buňky, ze které vychází bičíky s ploutvičkami (je možné, že jde o exkavátní znaky).

5. Ze stabilních kultur se nám podařilo vytvořit monoeukaryotické kultury. Díky tomu budeme moci analyzovat jejich transkriptomy a srovnat jejich energetický metabolizmus s parazitickými příbuznými (*Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*).

7. Seznam citované literatury

Adl SM, Leander BS, Simpson AGB, Archibald JM, Anderson OR, Bass D, Bowser SS, Brugerolle G, Farmer MA, Karpov S, Kolisko M, Lane CE, Lodge DJ, Mann DG, Meisterfeld R, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Smirnov AV, Spiegel F (2007) Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology* 56: 684-689.

Amos WB, Grimstone AV, Rotschild LJ, Allen RD (1979) Structure, protein composition and birefringence of the costa: a motile flagellar root fibre in the flagellate *Trichomonas*. *Journal of Cell Science* 35: 139-164.

Benchimol M (2009) Hydrogenosomes under microscopy**.** *Tissue Cell* 41: 151-168.

Bernard C, Simpson AGB, Patterson D (1997) An ultrastructural study of a free-living retortamonad, *Chilomastix cuspidata* (Larsen & Patterson, 1990) n. comb. (Retortamonadida, Protista). *European Journal of Protistology* 33: 254-265.

Bernard C, Simpson AGB, Patterson DJ (2000) Some free-living flagellates (Protista) from anoxic habitats. *Ophelia* 52: 113-142.

Bishop A (1935) Observations upon "*Trichomonas*" from pond water. *Parasitology* 27: 246-256.

Bishop A (1938) *Histomonas meleagridis* in domestic fowls (*Gallus gallus*). Cultivation and experimental infection. *Parasitology* 30: 181-194.

Bishop A (1939) A note upon the systematic position of „*Trichomonas*" *keilini* (Bishop, 1935). *Parasitology* 31: 469-472.

Brugerolle G (1975) Etude de la cryptopleuromitose et de la morphogenese de division chez *Trichomonas vaginalis* et chez plusieurs genres de Trichomonadines primitives. *Protistologica* 11: 457-468.

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 diversty of trichomonads as the basis for systematic and evolutionary considerations. *Acta Universitatis Carolinae – Biologica* 30: 199-210.

Brugerolle G, Breunig A, König H (1994) Ultrastructural study of *Pentatrichomonoides* sp., a trichomonad flagellate from *Mastotermes darwiniensis*. *European Journal of Protistology* 30: 372-378.

Brugerolle G (1991) Flagellar and cytoskeletal systems in amitochondrial flagellates: Archamoeba, Metamonada and Parabasala. *Protoplasma* 164: 70-90.

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 (1999) Fine structure of *Pseudotrypanosoma giganteum* of *Prototermes*, a trichomonad with a contractile costa. *European Journal of Protistology* 35: 121-128.

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

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, Radek R (2006) Symbiotic Protozoa of Termites. In König H, Varma A (eds) Intestinal Microorganisms of Termites and other Invertebrates. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 243-269.

Bunbury N, Jones CG, Greenwood AG, Bell DJ (2007) *Trichomonas gallinae* in mauritian columbids: implications for an endangered endemic. *Journal of Wildlife Diseases* 43: 399-407.

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

Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UCM, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CHJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Miller S, Desek D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CHY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Pertea M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CHL, Osoegawa K, Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM, Henze K, Gupta A, Wang CHC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzburg SL, Tang P, Chiu CHH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Ligget CM, Johnson PJ (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315: 207-212.

Cavalier-Smith T (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 297-354.

Cavalier-Smith T (2003) The excavate protozoan phyla Metamonada Grasse´ 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 komplex 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 of the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 542-551.

Cepicka I, Hampl V, Kulda J (2010) Critical taxonomical revision of parabasalids with descriptions of one new genus and three new species. *Protist* 161: 400-433.

Cobo ER, Cano D, Campero CM (2001) Experimental infection with *Tritrichomonas suis* in heifers. *Veterinary Parasitology* 99: 73-78.

Čerkasov J, Čerkasovová A, Kulda J and Vilhelmová D (1978) Respiration of hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*: I ADP-dependent of malate and pyruvate. *Journal of Biological Chemistry* 253: 1207-1214.

Dacks JB, Redfield RJ (1998). Phylogenetic placement of *Trichonympha*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 445-447.

Delgado-Viscogliosi P, Viscogliosi E, Gerbod D, Kulda J, Sogin ML, Edgcomb VP (2000) Molecular phylogeny of parabsalids based on small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Trichomonadinae subfamily. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47: 70-75.

Dolan MF, Wier AM, Melnitsky H, Whiteside JH, Margulis L (2004) Cysts and symbionts of *Staurojoenina assimilis* Kirby from *Neotermes*. *European Journal of Protistology* 40: 257-264.

Dolezal P, Smíd O, Rada P, Zubácová Z, Bursać D, Suták R, Nebesárová J, Lithgow T, Tachezy J (2005) *Giardia* mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 10924-10929.

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.

Felsenstein J (1989) PHYLIP – Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.

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.

Grimstone AV, Gibbons IR (1966) The fine structure of the centriolar apparatus and associated structures in the complex flagellates *Trichonympha* and *Pseudotrichonympha*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 250: 215-242.

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

Hampl V, Cepicka I, Flegr J, Tachezy J & Kulda J (2007) Morphological and molecular diversity of the monocercomonadid genera *Monocercomonas*, *Hexamastix*, and *Honigbergiella* gen. nov. *Protist* 158: 365-383.

Hampl V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AG, Roger AJ (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among

eukaryotic ”supergroups“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 3859-3864.

Honigberg BM (1951) Structure and morphogenesis of *Trichomonas prowazeki* Alexeieff and *Trichomonas brumpti* Alexeieff. *University of California Publications in Zoology* 55: 337-394.

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

Honigberg BM, Mattern CFT, Daniel WA (1968) Structure of *Pentatrichomonas hominis* (Davaine) as revealed by electron microscopy. *Journal of Protozoology* 15: 419-430.

Hrdy I, Tachezy J, Müller M (2008) Metabolism of trichomonad hydrogenosomes. V Hydrogenosomes and mitosomes: Mitochondia of anaerobic eukaryotes (Tachezy J, Ed.). Série: Microbiology monographs, Springer, Heidelberg, 2008.

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.

Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG (2004) Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 553-570.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059-3066.

Keeling PJ, Polsen N, McFadden GI (1998) Phylogenetic diversity of parabasalian symbionts from termites, including the phylogenetic position of *Pseudotrypanosoma* and *Trichonympha*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 643-650.

Kolisko M, Cepicka I, Hampl V, Leigh J, Roger AJ, Kulda J, Simpson AGB, Flegr J (2008) Molecular phylogeny of diplomonads and enteromonads based on SSU rRNA, alpha-tubulin and HSP90 genes: Implications for the evolutionary history of the double karyomastigont of diplomonads. BMC Evolutionary Biology 8: 205.

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

Li L, Fröhlich J, König H (2006) Cellulose digestion in the termite gut. In König H, Varma A (eds) Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 221-241.

Lindmark DG and Müller M (1973) Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 248: 7724-7728.

Lund EE, Augustine PC, Chute AM (1967) *Histomonas meleagridis* after one thousand in vitro passages. *Journal of Protozoology* 14: 349-351.

Mattern CTF, Honigberg BM, Daniel WA (1967) Mastigont system of *Trichomonas gallinae* (Rivolta) as revealed by electron microscopy. *Journal of Protozoology* 14: 320-339.

Mattern CFT, Honigberg BM and Daniel WA (1973). Fine-structural changes associated with pseudocyst formation in *Trichomitus batrachorum. Journal of Protozoology.* 20: 222-229.

McDougald LR and Reid WM (1978) *Histomonas meleagridis* and relatives. In Parasitic Protozoa. II (Kreier, JP, ed.), Academic Press, Inc., New York. 139-161.

Ohkuma M, Ohkoto K, Iida T, Tokura M, Moriya S, Usami R, Horikoshi K, Kudo T (2000). Phylogenetic identification of hypermastigotes, *Pseudotrichomnympha*, *Spirotrichonympha*, *Holomastigotoides*, and parabasalian symbionts in the hindgut of termites. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 47: 249-259.

Ohkuma M, Saita K, Inoue T, Kudo T (2007) Comparison of four protein phylogeny of parabasalian symbionts in termite guts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 847-853.
Pecka Z, Nohýnková E, Kulda J (1996) Ultrastructure of *Cochlosoma anatis* Kotlán, 1923 and taxonomic position of the family Cochlosomatidae (Parabasala: Trichomonadida). *European Journal of Protistology* 32: 190-201.

Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Gerber G (1998) Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Review* 11: 300-317.

Radek R (1997) *Spirotrichonympha minor* n. sp., a new hypermastigote termite flagellate. *European Journal of Protistology* 33: 360-374.

Rybicka K, Honigberg BM and Holt SC (1972) Fine structure od the mastigont system in culture forms of *Histomonas meleagridis* (Smith). *Protistologica* 8: 107-120.

Silberman JD, Clark CG, Diamond LS, Sogin ML (1999) Phylogeny of the genera *Entamoeba* and *Endolimax* as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1740-1751.

Simpson AGB and Patterson NJ (2001) On core Jakobids and Excavate taxa: The ultrastructure of *Jakoba incarcerata*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 480-492.

Simpson AGB (2003) Cytoskeleton organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1959-1777.

Simpson AGB and Roger AJ (2004) Excavata and the origin of amitochondriate eukaryotes. In Hirt RP and Horner DS (ed.): Organelles, Genomes and Eukaryote Phylogeny, 27-45. CRC Press, London.

Simpson AGB, Inagaki Y, Roger AJ (2006) Comprehensive multigene phylogenies of excavate protists reveal the evolutionary positions of primitive eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 23: 615-625.

Stabler RM (1954) *Trichomonas gallinae*: a review. *Experimental Parasitology* 3: 368-402.

Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.

Tachezy J, Tachezy R, Hampl V, Šedinová M, Vaňáčová Š, Vrlík M, van Ranst M, Flegr J, Kulda J (2002) Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 154-163.

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

Yubuki N, Céza V, Cepicka I, Yabuki A, Inagaki Y, Nakayama T, Inouye I, Leander BS (2010) Cryptic Diversity of Free-living Parabasalids, *Pseudotrichomonas keilini* and *Lacusteria cypriaca* n. gen., n. sp., as Inferred from small subunit rDNA Sequences. *The Journal of Eukaryotic Mikrobiology* 57: 554-561.

8. Příloha 1

The Journal of
Eukaryotic Microbiology

Published by the International Society of Protistologists

J. Eukaryot. Microbiol., 57(6), 2010 pp. 554–561
© 2010 The Author(s)
Journal of Eukaryotic Microbiology © 2010 International Society of Protistologists
DOI: 10.1111/j.1550-7408.2010.00509.x

Cryptic Diversity of Free-Living Parabasalids, *Pseudotrichomonas keilini* and *Lacusteria cypriaca* n. g., n. sp., as Inferred from Small Subunit rDNA Sequences

NAOJI YUBUKI,[a] VÍT CÉZA,[b] IVAN CEPICKA,[b] AKINORI YABUKI,[c] YUJI INAGAKI,[c,d] TAKESHI NAKAYAMA,[c]
ISAO INOUYE[c] and BRIAN S. LEANDER[a]

[a]*Departments of Botany and Zoology, Canadian Institute for Advanced Research, Program in Integrated Microbial Biodiversity, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z4, and*
[b]*Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic, and*
[c]*Institute for Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan, and*
[d]*Center for Computational Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan*

ABSTRACT. Ultrastructural and molecular phylogenetic evidence indicate that the Parabasalia consists of seven main subgroups: the Trichomonadida, Honigbergiellida, Hypotrichomonadida, Tritrichomonadida, Cristamonadida, Spirotrichonymphida, and Trichonymphida. Only five species of free-living parabasalids are known: *Monotrichomonas carabina*, *Ditrichomonas honigbergii*, *Honigbergiella* sp., *Tetratrichomonas undula*, and *Pseudotrichomonas keilini*. Phylogenetic analyses show that free-living species do not form a clade and instead branch in several different positions within the context of their parasitic relatives. Because the diversity of free-living parabasalids is poorly understood, the systematics of these lineages is in a significant state of disarray. In order to better understand the phylogenetic distribution of free-living parabasalids, we sequenced the small subunit rDNA from three different strains reminiscent of *P. keilini*; the strains were isolated from different geographical locations: (1) mangrove sediments in Japan and (2) sediments in Cyprus. These data demonstrated that the free-living parabasalids *P. keilini* and *Lacusteria cypriaca* n. g., n. sp., form a paraphyletic assemblage near the origin of a clade consisting mostly of parasitic trichomonadids (e.g. *Trichomonas vaginalis*). This paraphyletic distribution of similar morphotypes indicates that free-living trichomonadids represent a compelling example of morphostasis that provides insight into the suite of features present in the most recent free-living ancestor of their parasitic relatives.
Key Words. Excavate, *Honigbergiella*, new species, phylogeny, SEM, ultrastructure.

PARABASALIDS are anaerobic microeukaryotes that lack canonical mitochondria. Over 400 species of parabasalids have been described, and the vast majority of these are intestinal parasites/commensals of insects and vertebrates (Adl et al. 2007; Brugerolle and Lee 2000; Cepicka, Hampl, and Kulda 2010; Yamin 1979). The members of this diverse group of microeukaryotes share several morphological features, such as a parabasal apparatus (i.e. a Golgi complex associated with striated fibers), hydrogenosomes, and a closed mitosis with an external spindle (i.e. cryptopleuromitosis). The Parabasalia has historically been lumped into two main groups: Hypermastigida and Trichomonadida (Brugerolle 1991a; Corliss 1994; Honigberg 1963). The Hypermastigida consisted of species with large, highly multiflagellated cells (e.g. up to a thousand flagella) that thrive within the hindgut of wood-eating termites and cockroaches. The Trichomonadida, by contrast, consisted of much smaller and ultrastructurally simpler species, with six or fewer flagella per mastigont, that are generally beneficial symbionts, commensals, or pathogens in a wide variety of animals, including humans. *Trichomonas vaginalis*, for instance, thrives within the human urogenital tract, *Trichomonas tenax* thrives within the oral cavity of humans, and *Pentatrichomonas hominis* and *Dientamoeba fragilis* inhabit the human intestinal tract (Brugerolle and Lee 2000; Honigberg 1989; Honigberg and Brugerolle 1989; Honigberg, Mattern, and Daniel 1968; Stark et al. 2006).

Improved phylogenetic resolution of a larger sample of parabasalid species has now resulted in the recognition of seven main subgroups rather than two: Honigbergiellida, Trichomonadida, Hypotrichomonadida, Tritrichomonadida, Cristamonadida, Spirotrichonymphida, and Trichonymphida (Cepicka et al. 2010). Only a few free-living parabasalids have been described so far. *Honigbergiella*, *Monotrichomonas*, and *Ditrichomonas* are found in anoxic environments and possess one to three anterior flagella, depending on the genus, and a posterior flagellum (Bernard, Simpson, and Patterson 2000; Farmer 1993; Hampl et al. 2007). Phylogenetic analyses have demonstrated that these three genera cluster as a monophyletic assemblage forming the Honigbergiellidae. *Tetratrichomonas undula*, by contrast, was shown to branch within the Trichomonadida (Cepicka et al. 2010). *Pseudotrichomonas* was the first free-living parabasalid discovered (Bishop 1935, 1939) and is tentatively classified within the Honigbergiellidae based on ultrastructural features (Cepicka et al. 2010).

A culture labeled ''*Pseudotrichomonas keilini*'' is available in the American Type Culture Collection (ATCC 50321), and the small subunit (SSU) rDNA sequence derived from this culture is deposited in GenBank (AY319274). However, the identification of this strain as *P. keilini* was shown to be incorrect (Hampl et al. 2007); this strain lacks an undulating membrane, a diagnostic feature of *P. keilini* (Bishop 1935; Brugerolle 1991b; Lavier 1936a, b). The morphology of ATCC 50321 is identical to *Honigbergiella ruminantium*, and this inference has been confirmed with phylogenetic analyses of SSU rDNA sequences. Accordingly, ATCC 50321 has been renamed as a member of the genus *Honigbergiella* (Hampl et al. 2007). Moreover, while Dufernez et al. (2007) reported an endobiotic *Pseudotrichomonas* from cattle, this flagellate was also subsequently shown to belong to the genus *Honigbergiella* (see Cepicka et al. 2010). Therefore, neither a living culture nor a DNA sequence from a legitimate representative of *P. keilini* was available before this study.

Parasitic parabasalids from several different animal hosts have been characterized at both the morphological and molecular phylogenetic levels. Investigations of free-living parabasalids, by contrast, are scarce, mainly due to the relatively low number of living cultures available and to their low relevance to human health. Because the diversity and evolutionary history of free-living parabasalids is so poorly understood, the systematics of these lineages is in a significant state of confusion. Accordingly, we isolated, cultivated, and sequenced the SSU rDNA from three strains of free-living trichomonads reminiscent of the *P. keilini* morphotype that were isolated from different geographical locations: (1) marine mangrove sediments near Ishigaki Island (Japan) and (2) sediments of uncertain salinity near Voroklini (Cyprus). The main goal of this work was to

Corresponding Author: N. Yubuki, Department of Botany, Canadian Institute for Advanced Research, Program in Integrated Microbial Biodiversity, University of British Columbia, 3529-6270 University Boulevard, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z4—Telephone number: +1 604 822 4892; FAX number: +1 604 822 6089; e-mail: yubuki@interchange.ubc.ca

better understand the diversity and phylogenetic distribution of free-living parabasalids relative to parasitic lineages within the group.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and culture conditions. *Pseudotrichomonas keilini* NY0170 (Japan) was collected from mangrove sediments sampled in Ishigaki Island, Okinawa, Japan (24°46′N, 124°12′E) on September 19, 2005. Sediment samples ~ 2–4 cm deep were collected at low tide. The medium used for enrichment culture and maintenance of *P. keilini* NY0170 (Japan) was 5% modified PYNFH medium (ATCC medium 1034) prepared with sterilized seawater. A single cell was isolated by micropipetting from an enrichment culture and the clonal culture was established and maintained at 22 °C with passages every week. *Pseudotrichomonas keilini* NY0170 (Japan) has been deposited at the ATCC, Manasas, VA, USA (accession number PRA-328).

A different strain of *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus) and a novel lineage, namely *Lacusteria cypriaca* n. g., n. sp. (Cyprus), were collected in a single sample of sediments from a lake close to Voroklini village, Cyprus (34°58′N, 33°39′E), on February 26, 2008. The lake was close, but not connected, to the sea; the salinity of the lake was not determined. The sample was transferred to the Czech Republic and stored in a 15-ml tube at room temperature. The two strains were independently cultivated from the original sample at different times: 1 wk after the sampling time for *L. cypriaca*, and 1 mo after the sampling time for *P. keilini*. In both cases 2 ml of the sample were inoculated into Sonneborn's *Paramecium* medium (ATCC medium 802), and the culture was transferred into new medium once a week. However, the number of trichomonads in both the cultures started to decline after a few transfers. They were therefore inoculated into Dobell and Leidlaw's (1926) biphasic medium. *Pseudotrichomonas keilini* LIVADIAN (Cyprus) was able to grow in this medium indefinitely and the medium was used for the routine cultivation of this strain. *Trepomonas* sp. and an unidentified ciliate also persisted in this culture of *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus). The strain was cultivated at room temperature with transfers occurring once per week. In contrast, *L. cypriaca* (Cyprus) failed to grow in Dobell-Leidlaw's biphasic medium. The final medium for this isolate consisted of a 9:1 mixture of Sonneborn's *Paramecium* medium and TYSGM-9 (trypticase–yeast extract–serum–gastric mucin) medium without mucin and Tween 80 (Diamond 1982). *Trepomonas* sp. and an unidentified amoeba were also present in the culture of *L. cypriaca* and the density of *L. cypriaca* was usually very low. The strain was cultivated at room temperature with transfers occurring once per week. The strains LIVADIAN containing *P. keilini*, *Trepomonas* sp. and an unidentified ciliate, and LA containing *L. cypriaca* n. g., n. sp. *Trepomonas* sp. and an unidentified amoeba have been deposited in the culture collection of the Department of Parasitology of Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

Light and electron microscopy. Light microscopic observations were performed using a Zeiss Axioplan 2 imaging microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a Leica DC500 digital camera (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) or an Olympus Microscope BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) equipped with camera Olympus DP70.

In addition to live cells, the general morphology of *L. cypriaca* n. g., n. sp. (Cyprus) was examined in protargol-stained preparations. Moist films spread on cover slips were prepared from pelleted cultures obtained by centrifugation at 500 *g* for 8 min. The films were fixed in Bouin–Hollande's fluid for 10 h, washed with 70% ethanol, and stained with 1% (w/v) protargol (Bayer, I. G. Farbenindustrie, Frankfurt am Main, Germany) following Nie's (1950) protocol.

For scanning electron microscopy (SEM), cells of *P. keilini* NY0170 (Japan) were mixed with an equal volume of fixative containing 5% (v/v) glutaraldehyde and 0.2 M sucrose in 0.2 M sodium cacodylate buffer (SCB) (pH 7.2) and mounted on glass plates coated with poly-L-lysine at room temperature for 30 min. The glass plates were rinsed with 0.2 M SCB and fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide (OsO_4) for 30 min. The fixed cells were then rinsed with 0.2 M SCB and dehydrated with a graded ethanol series from 30% to absolute ethanol. Samples were critical point dried with CO_2 using a Tousimis Samdri Critical Point Dryer (Tousimis Research Corporation, Rockville, MD). Samples were then coated with gold using a Cressington 208HR high-resolution Sputter Coater (Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford, UK), and observed with a Hitachi S-4700 field emission SEM (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan).

For transmission electron microscopy, cell suspensions of *P. keilini* NY0170 (Japan) were mixed with an equal volume of fixative containing 5% (v/v) glutaraldehyde and 0.2 M sucrose in 0.2 M SCB (pH 7.2) at room temperature for 45 min. Cells were aggregated into a pellet by centrifugation at 1,000 *g* for 5 min and then rinsed with 0.2 M SCB (pH 7.2). The specimens were then fixed in 1% (w/v) OsO_4 in 0.2 M SCB (pH 7.2) at room temperature for 1 h followed by dehydration through an ethanol series, and substitution with acetone. The specimens were embedded in resin (Epon 812). Ultrathin sections were cut on a Leica EM UC6 ultramicrotome (Leica Microsystems) and double-stained with 2% (w/v) uranyl acetate and lead citrate (Reynolds 1963). Ultrathin sections were observed using a Hitachi H7600 TEM (Hitachi Ltd.).

DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) amplification, alignment, and phylogenetic analysis. Nearly the entire SSU rRNA genes of three different strains were sequenced at three different institutions: (1) the University of British Columbia, Canada for the 5′-end of the SSU rRNA gene of *P. keilini* NY0170 (Japan), (2) the University of Tsukuba for the rest of the SSU rRNA gene of *P. keilini* NY0170 (Japan), (3) Charles University, Czech Republic for nearly the entire SSU rRNA gene of both *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus) and *L. cypriaca* (Cyprus). The 5′-end of the SSU rRNA gene was amplified from genomic DNA extracted from the cells of *P. keilini* NY0170 (Japan) using the MasterPure Complete DNA and RNA purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, Madison, WI). The PCR was performed using a total volume of 25 µl and the PuRe Taq Ready-To-Go PCR beads kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Approximately 1,100 bp of the SSU rRNA gene were amplified from the genomic DNA using eukaryotic universal primers (PF1: 5′-GCGCTACC TGGTTGATCCTGCCAGT-3′ and nomet1134R: 5′- TTTAAG TTTCAGCCTTGCG-3′). The PCR protocol had an initial denaturation stage at 95 °C for 2 min; 35 cycles involving 94 °C for 45 s, 55 °C for 45 s, and 72 °C for 1.5 min; and final extension at 72 °C for 5 min. The amplified DNA fragments were purified from agarose gels using UltraClean 15 DNA Purification Kit (MO Bio Laboratories Inc., Carlsbad, CA). (2) Nearly the entire SSU rRNA gene was amplified from genomic DNA using eukaryotic universal primers (18sF: 5′-AACCTGGTTGATCCTGCCAG-3′ and 18sR: 5′-CYGCAGGTTCACCTACGGAA-3′). The PCR protocol had an initial denaturation stage at 95 °C for 1 min; 35 cycles involving 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 2.5 min; and final extension at 72 °C for 7 min. The amplified DNA fragments were purified from agarose gels using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Both the sequences were determined independently within 2 yr and were ensured to derive from the same strain of *P. keilini* NY0170 (Japan). Two clones were sequenced in total and no polymorphisms were detected.

Genomic DNA of *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus) and *L. cypriaca* (Cyprus) was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Nearly the entire SSU rRNA gene was amplified using

trichomonad-specific primers 16Sl: 5′-TACTTGGTTGATCCTGCC-3′ (Tachezy et al. 2002) and 16SRR: 5′-TCACCTACCGTTACCTTG-3′ (Cepicka et al. 2005). The PCR was performed in a volume of 50 µl using *Taq* DNA polymerase (Fermentas) in an appropriate buffer. The PCR protocol had an initial denaturation stage at 94 °C for 4 min; 30 cycles involving 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min, and 72 °C for 2.5 min; and final extension at 72 °C for 10 min. The amplified DNA fragments were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and were directly sequenced. Both the isolates were sequenced 3 times independently within a year to ensure that the cultures were stable and did not contain more parabasalid species. No intrastrain sequence polymorphism was detected. The three SSU rDNA sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession numbers HM581663 (*P. keilini*, Japan, NY0170), HM748760 (*P. keilini*, Cyprus, LIVADIAN), HM748759 (*L. cypriaca* n. g., n. sp., Cyprus).

The newly obtained sequences were aligned with those from taxa representing the major lineages of parabasalids, forming a 56-taxon alignment with 1,094 unambiguously aligned positions. PhyML was used for maximum-likelihood (ML) analyses with the GTR models incorporated invariable sites and a discrete gamma distribution (GTR+Γ+I). The model was selected by Modeltest 3.7 (Posada and Crandall 1998) in conjunction with PAUP*. Maximum-likelihood bootstrap analysis (1,000 replicates) was conducted with the same settings.

The alignment was also analyzed with the Bayesian method using MrBayes program 3.0 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) under GTR+Γ+I models. The program was set to operate with a gamma distribution and four Monte–Carlo–Markov chains starting from a random tree. A total of 2,000,000 generations was calculated with trees sampled every 50 generations and with a prior burn-in of 100,000 generations with 2,000 sampled trees discarded. A majority rule consensus tree was constructed from 38,000 post-burn in trees. Posterior probabilities corresponded to the frequency at which a given node was found in the post-burn in trees.

RESULTS

Morphology of *Pseudotrichomonas keilini* NY0170 (Japan), *Pseudotrichomonas keilini* LIVADIAN (Cyprus), and *Lacusteria cypriaca* n. g., n sp. (Cyprus). The three strains of free-living trichomonads were similar under the light microscope, except for differences in details of the undulating membrane (Fig. 1–6). Two of the strains, namely *P. keilini* NY0170 (Japan) and *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus), corresponded to the diagnostic features of *P. keilini* described by Bishop (1935, 1939) and Brugerolle (1991b), which included three anterior flagella, an undulating membrane, and the absence of a costa. Because the recognition of *P. keilini* in natural samples has been confounded following the deposition of the misidentified ATCC 50321, the morphological features of our three strains will be described briefly here. Although our two strains of *P. keilini* were morphologically identical, they were isolated from very different geographical locations and aquatic habitats: *P. keilini* NY0170 (Japan) was collected from mangrove sediments in Japan and maintained in seawater medium, and *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus) was isolated from a pond of uncertain salinity in Cyprus and maintained in freshwater medium. The living cells of *P. keilini* NY0170 (Japan), excluding the extended axostyle, were 10.7 µm (8.5–13.7 µm) long and 7.8 µm (5.3–9.9 µm) wide ($n = 20$) (Fig. 1, 2). The *Trichomonas*-type axostyle extended from the posterior end of the cell and the protruding part was 7.1 µm (4.1–11.9 µm) long. Living cells of *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus), excluding the extended axostyle, were 9.4 µm (8.2–10.5 µm) long and 7.1 µm (6.1–8.3 µm) wide ($n = 20$) (Fig. 3, 4). The *Trichomonas*-type axostyle extended from the posterior end of the cell and the protruding part was 5.8 µm (4.9–7.0 µm) long. The cells of both strains were

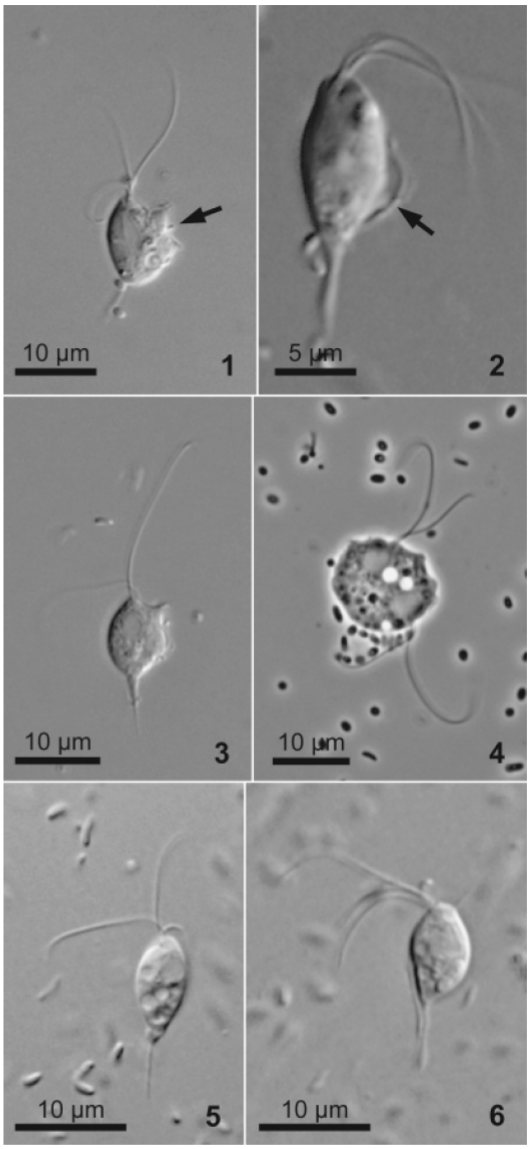


Fig. **1–6.** Light micrographs of *Pseudotrichomonas keilini* NY0170 (Japan), *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus), and *Lacusteria cypriaca* n. g., n. sp. (Cyprus). **1.** A cell of *P. keilini* NY0170 (Japan) with three anterior flagella and a posterior flagellum (arrow) along with an undulating membrane. **2.** A cell of *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus) with three anterior flagella and a posterior flagellum (arrow) along with an undulating membrane. **3.** An immature cell of *P. keilini* NY0170 (Japan) with two anterior flagella. **4.** A dividing cell of *P. keilini* NY0170 (Japan) with two nuclei and two pairs of anterior flagella. This cell is slightly compressed and enlarged by a cover slip. **5.** A cell of *L. cypriaca* n. g., n. sp. (Cyprus) showing three anterior flagella and an axostyle. **6.** A cell of *L. cypriaca* (Cyprus) showing three anterior flagella and an undulating membrane.

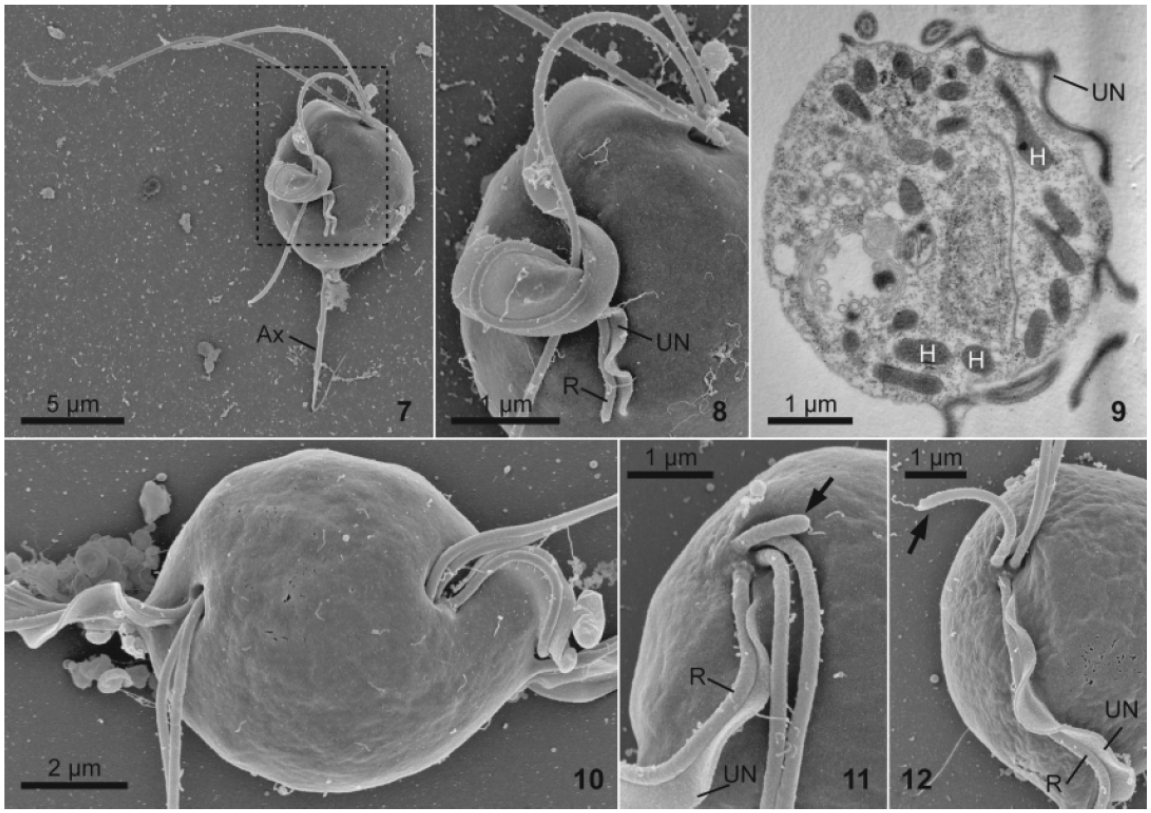


Fig. **7–12.** Electron micrographs of *Pseudotrichomonas keilini* NY0170 (Japan). **7.** A scanning electron micrograph showing three anterior flagella, posterior flagellum with an undulating membrane and an axostyle (Ax). See Fig. 8 for the dotted box. **8.** Detail in the dotted box of Fig. 7 showing the lamelliform undulating membrane (UN) and the termination of the recurrent flagellum (R). **9.** Transmission electron micrograph showing the UN and hydrogenosomes (H). A costa was not observed under the UN. **10.** A dividing cell with two pairs of two anterior flagella and a posterior flagellum. **11.** An immature cell with a short anterior flagellum (arrow) adjacent to two mature anterior flagella. **12.** An immature cell with a short anterior flagellum (arrow) adjacent to two mature anterior flagella.

highly plastic in shape and had three unequal anterior flagella and a posterior recurrent flagellum with a well-developed lamellar-type undulating membrane displaying several waves (Fig. 1–4). The undulating membrane usually reached the posterior end of the cell body. The distal end of the posterior flagellum did not extend beyond the undulating membrane (Fig. 7, 8). The cells contained a large number of elongated hydrogenosomes and lacked a supporting costa beneath the undulating membrane (Fig. 9). Dividing cells and/or immature cells had only two anterior flagella, rather than the normal three (Fig. 3, 4, 10–12). We did not observe a comb-like structure, an infrakinetosomal body, or cyst formation. The strains grew at 16–24 °C and died at 37 °C.

The culture of *L. cypriaca* n. g., n. sp. (Cyprus) consisted of cells that were superficially similar to the morphology of the two *P. keilini* strains (Fig. 5, 6). The living cells of *L. cypriaca*, excluding the extended axostyle, were 8.0 µm (5.0–10.7 µm) long and 5.5 µm (3.6–7.6 µm) wide ($n = 20$). The *Trichomonas*-type axostyle extended from the posterior end of the cell and the protruding part was 4.9 µm (3.1–6.7 µm) long. In contrast to *P. keilini*, which possessed a conventional undulating membrane, the undulating membrane of *L. cypriaca* was weakly developed and usually displayed only a single big wave (Fig. 5, 6). Moreover, the undulating membrane was highly variable in length; sometimes it reached only to one half of the cell whereas in other cases it reached to the posterior end. The distal end of the recurrent flagellum was usually free. However, in some cells the free portion was rather short or could not be detected at all. Protargol-stained preparations allowed us to examine the internal structures of the cells as well. A parabasal body formed a small dark disc close to the nucleus, and a pelta was normally developed. A costa was not observed (Fig. 13–16).

Molecular phylogenetic positions of *Pseudotrichomonas keilini* NY0170 (Japan), *Pseudotrichomonas keilini* LIVADIAN (Cyprus), and *Lacusteria cypriaca* n. g., n. sp. (Cyprus). We determined the nearly complete sequence of the SSU rRNA gene from all three strains and used these to evaluate their phylogenetic positions within the Parabasalia using a 53-taxon alignment. The ML and Bayesian analyses of this alignment resulted in a poorly resolved backbone that gave rise to the following strongly supported clades: the Trichonymphida, Hypotrichomonadida, Cristamonadida, and Spirotrichonymphida. The Honigbergiellida and the Tritrichomonadida formed paraphyletic assemblages. The

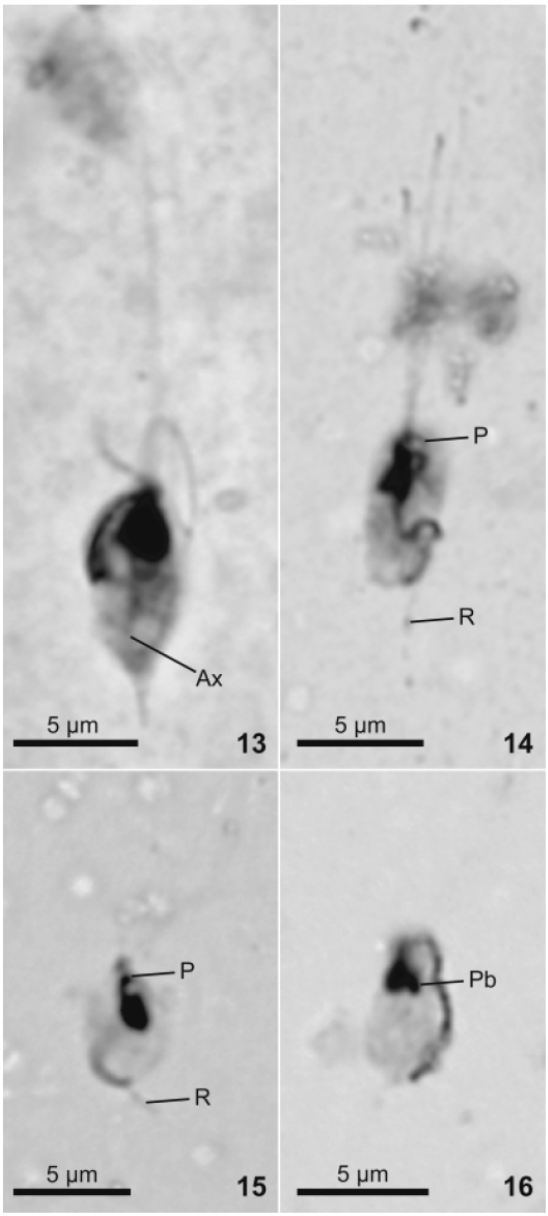


Fig. **13–16.** Protargol-stained specimens of *Lacusteria cypriaca* n. g., n. sp. (Cyprus) showing an axostyle (Ax), a pelta (P), a parabasal body (Pb), and a recurrent flagellum (R).

SSU rDNA sequences from the three different strains did not form an independent clade and did not branch with the free-living *T. undula* or the free-living lineages within the Honigbergiellida. Instead, they formed two independent lineages closely related to the Trichomonadida clade (Fig. 17). The two strains of *P. keilini* formed a robust clade within the Trichomonadida, at the base of the so-called ''*Pentatrichomonas*-group'' (i.e. *Pentatrichomonas*, *Pseudotrypanosoma*, and *Trichomitopsis*) (Cepicka et al. 2010). *Lacusteria cypriaca* n. g., n. sp. was more basal and branched as the sister lineage to the entire trichomonadid clade with high statistical support (Fig. 17).

DISCUSSION

Interpretation of morphology and phylogenetic position of *Pseudotrichomonas* and *Lacusteria* n. g. Following the discovery of *P. keilini* as the first known free-living parabasalid (Bishop 1935, 1939), this species was subsequently reported from several different geographical locations, mainly in freshwater environments (Bernard et al. 2000; Brugerolle 1991b; Lavier 1936a, 1936b). The morphology of our two independent strains of *P. keilini* (NY0170, Japan, and LIVADIAN, Cyprus) was identical to the morphology of *P. keilini* isolated from freshwater ponds by Bishop (1935, 1939) and Brugerolle (1991b). Although Bishop (1935) reported a constant number of anterior flagella, we observed immature cells with fewer anterior flagella in both our strains of *P. keilini*. Because *P. keilini* NY0170 (Japan) was derived from a single diligently washed cell, the possibility that the culture was contaminated by another trichomonad species is highly unlikely. We interpret the presence of cells with a different number of anterior flagella as reflecting different stages in the cell cycle.

Before this molecular phylogenetic study, *P. keilini* was tentatively classified within the Honigbergiellida based on (1) the absence of an infrakinetosomal body, comb-like structure, and costa, and (2) the presence of a lamelliform undulating membrane and three anterior flagella (Cepicka et al. 2010). This preliminary placement of *Pseudotrichomonas* was also supported by the fact that the Honigbergiellida contained the only free-living trichomonads. However, our phylogenetic analyses of the SSU rDNA data clearly demonstrated that these strains robustly clustered within the Trichomonadida instead of the Honigbergiellida.

The SSU rDNA sequences from *P. keilini* NY0170 (Japan) and *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus) were similar and differed by only 21 of 1,499 bp. The SSU rDNA sequences from *L. cypriaca* n. g., n. sp. differed from the sequences from *P. keilini* NY0170 (Japan) and *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus) by 112 of 1,515 bp and 111 of 1,513 bp, respectively. These differences in the SSU rDNA sequences were reflected in the phylogenetic trees, which showed that *L. cypriaca* and *P. keilini* do not form a clade. Although the two species were similar when observed under the light microscope, the molecular phylogenetic results were consistent with subtle morphological differences in the details of the undulating membrane. *Lacusteria cypriaca* n. g., n. sp. robustly formed a sister lineage to the Trichomonadida; the clade consisting of *P. keilini* NY0170 (Japan) and *P. keilini* LIVADIAN (Cyprus) was specifically related to the *Pentatrichomonas*-group within the Trichomonadida, albeit without strong statistical support. Nonetheless, neither species was closely related to the free-living *T. undula*.

The Trichomonadida includes seven or eight genera, depending on the status of *Trichomonoides trypanoides*, which possess a B-type costa and four or five anterior flagella. Because both *Pseudotrichomonas* and *Lacusteria* n. g. possess three anterior flagella and lack a costa, the close relationship between these lineages and the Trichomonadida was unexpected on the basis of morphological features alone; therefore, the molecular phylogenetic data were necessary to recover this relationship.

There are two types of costae in the Parabasalia: the A type found in the Tritrichomonadidae, *Trichomitus*, and some cristamonadids, and the B type found only in the Trichomonadida. However, several parabasalids lack a costa altogether, such as *Monocercomonas*, *Simplicimonas*, the Dientamoebidae, the

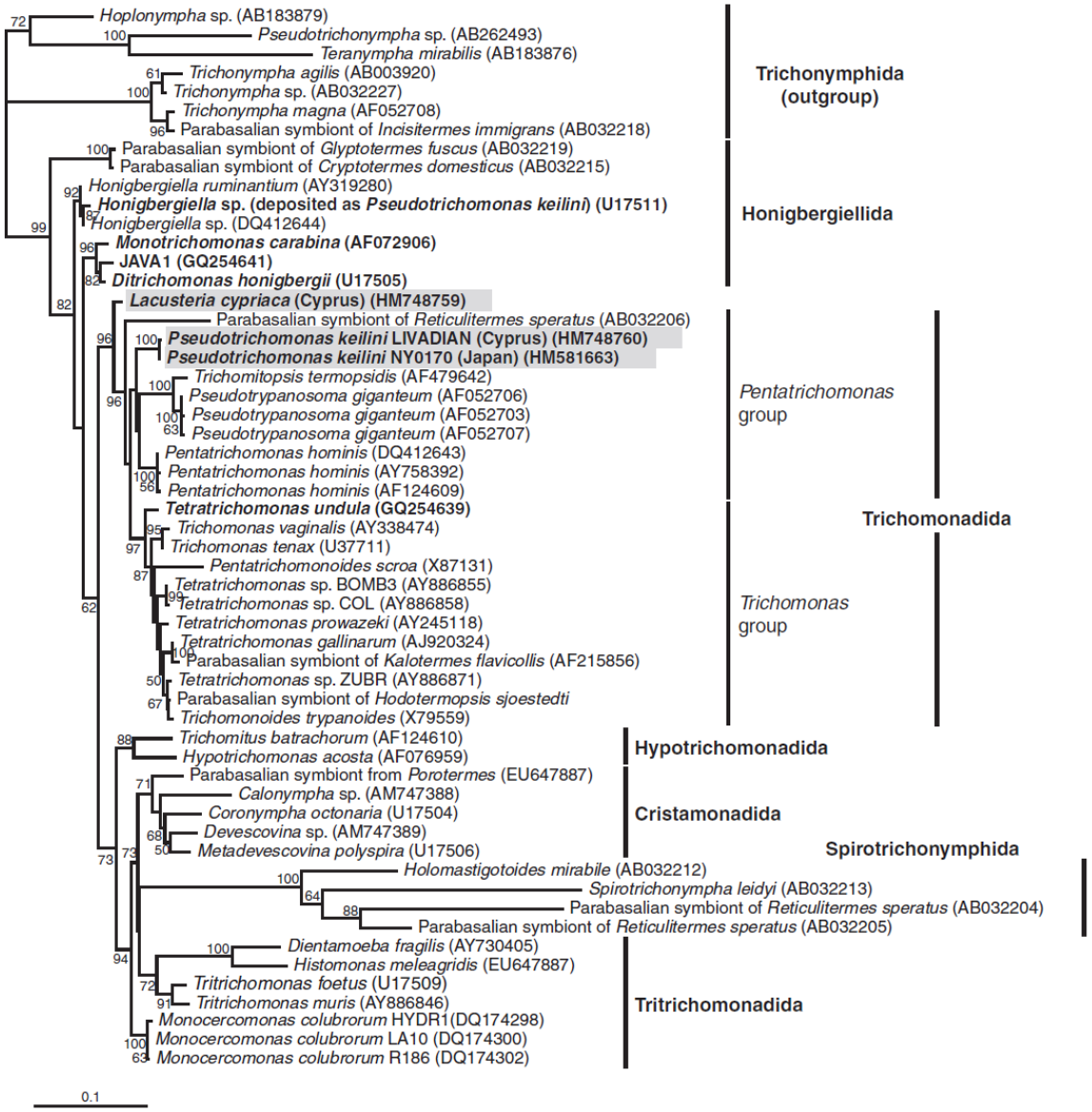


Fig. 17. Maximum-likelihood (ML) tree inferred from 56 small subunit (SSU) rRNA sequences and the GTR+G+I model. Maximum-likelihood bootstrap values over 50 are shown at the nodes and Bayesian posterior probabilities ≥ 0.95 are represented by thick lines. The sequences recovered from free-living parabasalians are in bold. GenBank accession numbers follow each taxon name. The scale bar represents inferred evolutionary distance in changes/site.

Honigbergiellida, the Spirotrichonymphida, the Trichonymphida, and most cristamonds (Cepicka et al. 2010; Hampl et al. 2004). The mosaic distribution of costate/acostate parabasalids in molecular phylogenetic trees can be explained by either multiple independent origins of a costa, multiple independent losses of a costa, or a combination of independent losses and gains (see Cepicka et al. 2010). The hypothesis that the costa has been lost several times independently has been favored in almost every previous study. In this context, the absence of a costa in both *Pseudotrichomonas* and *Lacusteria* might also represent secondary losses, even though both the *Trichomonas*-group and the *Pentatrichomonas*-group possess a B-type costa. Moreover, the character evolution of fewer flagella in *Pseudotrichomonas* and *Lacusteria* (i.e. whether three anterior flagella represents a shared ancestral state or independent losses from an ancestral state consisting of four to five anterior flagella) remains a

matter of speculation within the current molecular phylogenetic context.

Nonetheless, we have established *L. cypriaca* as a new genus and species because the morphological and molecular phylogenetic data presented here demonstrate that these free-living trichomonadids constitute a separate and distinct lineage within the Parabasalia.

TAXONOMIC SUMMARY

Phylum Parabasalia
Class Trichomonadea
Order Trichomonadida
Family Trichomonadidae
Pseudotrichomonas Bishop, 1939

We transfer the genus *Pseudotrichomonas* into the order Trichomonadida and the family Trichomonadidae based on the phylogenetic relationships.

Lacusteria n. g.

Description. Three unequal anterior flagella. Recurrent flagellum forms a weakly developed undulating membrane of variable length with a single wave. The distal end of the posterior flagellum free at least in some cells. Costa absent. Parabasal body ellipsoidal. Axostyle of *Trichomonas*-type. Phylogenetically distinct from other undulating-membrane-bearing parabasalid genera.

Type species. *Lacusteria cypriaca* sp. n.

Other species. None.

Etymology. A Latin adjective *lacuster* has meaning of ''inhabiting lakes'' in English and *-ia* is a Latin diminutive. This generic name refers the habitat of the organism. The name *Lacusteria* is considered to be of feminine gender.

Lacusteria cypriaca n. sp.

Description. Characteristics of the genus. Body size, without the axostyle protrusion, 8.0 ± 1.3 (5.0–10.7) µm long and 5.5 ± 0.9 (5.0–7.6) µm wide. Protruding part of axostyle measuring 4.9 ± 0.8 (4.9–6.7) µm.

Type material. One hapantotype slide (6/69) and three paratype slides (6/43, 6/44, 6/45) with protargol-stained preparations of *L. cypriaca* are deposited in the collection of the Department of Parasitology, Charles University in Prague, Czech Republic.

Type culture. Strain LA deposited in culture collection of the Department of Parasitology of Charles University in Prague, Prague, Czech Republic.

Type habitat. Pond near Voroklini village, Cyprus (34°58′N, 33°39′E).

Habitat. Low oxygen sediments.

Etymology. The specific name *cypriaca* refers to the geographical location where the type strain was collected. The species epithet agrees with the feminine gender of the generic name *Lacusteria*.

Gene sequence. Nearly complete sequence of SSU rRNA gene of the type isolate LA is deposited in GenBank under accession number HM748759.

The diversity of free-living parabasalids. One arrangement of four or five basal bodies, so-called ''privileged basal bodies'' consisting of parallel basal bodies of anterior flagella plus one orthogonal basal body of the recurrent flagellum, is inferred to be a synapomorphy for the Parabasalia. This basic cytoskeletal system is best reflected in free-living trichomonads, like the three strains described here, and symbiotic lineages of trichomonadids, tritrichomonadids, and hypotrichomonadids. In some symbiotic lineages, like the Trichonymphea and a few others, parts of this basic system can be repeated many times within a single, highly complex cell. Molecular phylogenetic analyses based on several different molecular markers have shown that the Trichonymphea form the sister group to the rest of the parabasalids (Gerbod et al. 2004; Keeling, Poulsen, and McFadden 1998; Ohkuma et al. 2007). Our hypothesis is that parabasalids containing one system of privileged basal bodies represent the morphology and lifestyle of the most recent parabasalid ancestor.

Molecular phylogenetic data suggest that the nearest sister lineage to the Parabasalia is the Fornicata, which includes diplomonads (e.g. *Giardia*, *Spironucleus*, *Octomitus*, and *Enteromonas*) and retortamonads (*Retortamonas* and *Chilomastix*) (Hampl et al. 2009). In addition, a large number of free-living fornicates from anaerobic environments have been recognized with culture-dependent surveys and environmental PCR surveys (e.g. *Carpediemonas*, *Dysnectes*, *Hicanonectes*, and *Kipferlia*), and these lineages branch near the origin of the more inclusive group (Kolisko et al. 2010; Park et al. 2009; Simpson et al. 2002; Yubuki et al. 2007). This phylogenetic distribution of free-living lineages strongly suggests that the most recent ancestor of the Fornicata was free-living. Although parabasalids also evolved from free-living ancestors at some point in their evolutionary history, it is currently unclear what this common ancestor was like. Our study sheds some light on this question by demonstrating a phylogenetic pattern of free-living *Lacusteria*/*Pseudotrichomonas*-like lineages that form a paraphyletic stem group from which parasitic lineages of trichomonadids (e.g. *Trichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas*, *Cochlosoma*, *Pseudotrypanosoma*, and *Trichomitopsis*) might have evolved. Nonetheless, current molecular phylogenetic evidence does not allow us to confidently infer whether different free-living parabasalids reflect ancestral modes of life (i.e. morphostasis), reflect lineages derived from endobiotic ancestors, or reflect some combination of both possibilities.

Nonetheless, before this study, only two lineages of free-living parabasalids, namely the Honigbergiellida and *T. undula*, were known. The three free-living strains we describe here branch separately from the previously known free-living lineages, which indicates that free-living parabasalids are more diverse and phylogenetically interspersed than recognized previously. There are now at least four independent free-living lineages that are distributed throughout the Parabasalia: Honigbergiellidae (*Honigbergiella*, *Monotrichomonas*, and *Ditrichomonas*), *T. undula*, *P. keilini*, and *L. cypriaca* n. g., n. sp. These lineages likely represent only a very small fraction of the total number of free-living parabasalids on earth. Accordingly, continued exploration of the overall diversity of free-living parabasalids is expected to significantly improve our understanding of the origins and early evolution of their important parasitic relatives and the group as a whole.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Tula Foundation (Centre for Microbial Diversity and Evolution at the University of British Columbia), the Canadian Institute for Advanced Research, Program in Integrated Microbial Biodiversity, the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (project MSM0021620828), the Czech Science Foundation (project 206/08/P275), the Grant Agency of Charles University (project 24810) and the Japan Society for the Promotion of Science (project 21370031).

[Correction made after publication September 28, 2010: Fig.17 has been replaced because the posterior probabilities were missing in the the phylogenetic tree.]

LITERATURE CITED

Adl, S. M., Leander, B. S., Simpson, A. G. B., Archibald, J. M., Anderson, O. R., Bass, D., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Farmer, M. A., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C. E., Lodge, D. J., Mann, D. G., Meisterfeld, R.,

Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Smirnov, A. V. & Spiegel, F. 2007. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst. Biol.*, **56**:684–689.

Bernard, C., Simpson, A. G. B. & Patterson, D. J. 2000. Some free-living flagellates (Protista) from anoxic habitats. *Ophelia*, **52**:113–142.

Bishop, A. 1935. Observation upon a ''*Trichomonas*'' from pond water. *Parasitology*, **27**:246–256.

Bishop, A. 1939. A note upon the systematic position of ''*Trichomonas*'' *keilini* (Bishop, 1935). *Parasitology*, **31**:469–472.

Brugerolle, G. 1991a. Flagellar and cytoskeletal systems in amitochondrial flagellates: Archamoeba, Metamonada and parabasala. *Protoplasma*, **164**:70–90.

Brugerolle, G. 1991b. Cell organization in free-living amitochondriate heterotrophic flagellates. *In*: Patterson, D. J. & Larsen, J. (ed.), Biology of Free-Living Heterotrophic Flagellates. Clarendon Press, Oxford. p. 133–148.

Brugerolle, G. & Lee, J. J. 2000. Phylum Parabasalia. *In*: Lee, J. J., Leedale, G. F. & Bradbury, P. (ed.), An Illustrated Guide to the Protozoa. 2nd ed. Allen Press, Lawrence. p. 1196–1250.

Cepicka, I., Hampl, V. & Kulda, J. 2010. Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist*, **161**:400–433.

Cepicka, I., Kutišová, K., Tachezy, J., Kulda, J. & Flegr, J. 2005. Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Vet. Parasitol.*, **128**:11–2.

Corliss, J. O. 1994. An interim unilitariam (''user-friendly'') hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozool.*, **33**:1–51.

Diamond, L. S. 1982. A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other human-dwelling protozoa. *J. Parasitol.*, **68**:958–959.

Dobell, C. & Leidlaw, P. P. 1926. On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology*, **18**:293–318.

Dufernez, F., Walker, R. L., Noël, C., Caby, S., Mantini, C., Delgado-Viscogliosi, P., Ohkuma, M., Kudo, T., Capron, M., Pierce, R. J., Villanueva, M. R. & Viscogliosi, E. 2007. Morphological and molecular identification of non-*Tritrichomonas foetus* trichomonad protozoa from the bovine preputial cavity. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **54**:161–168.

Farmer, M. A. 1993. Ultrastructure of *Ditrichomonas honigbergii* n. g., n. sp. (Parabasalia) and its relationship to amitochondrial protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **40**:619–626.

Gerbod, D., Sanders, E., Moriya, S., Nöel, C., Takasu, H., Fast, N. M., Delgado-Viscogliosi, P., Ohkuma, M., Kudo, T., Capron, M., Palmer, J. D., Keeling, P. J. & Viscogliosi, E. 2004. Molecular phylogenies of Parabasalia inferred from four protein genes and comparison with rRNA trees. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **31**:572–580.

Hampl, V., Cepicka, I., Flegr, J., Tachezy, J. & Kulda, J. 2004. Critical analysis of the topology and rooting of the parabasalian 16S rRNA tree. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **32**:711–723.

Hampl, V., Cepicka, I., Flegr, J., Tachezy, J. & Kulda, J. 2007. Morphological and molecular diversity of the monocercomonadid genera *Monocercomonas*, *Hexamastix*, and *Honigbergiella* gen. nov. *Protist*, **158**:365–383.

Hampl, V., Hug, L., Leigh, J. W., Dacks, J. B., Lang, B. F., Simpson, A. G. B. & Roger, A. J. 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic ''supergroups''. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**:3859–3864.

Honigberg, B. H. 1989. Taxonomy and nomenclature. *In*: Honigberg, B. M. (ed.), Trichomonads Parasitic in Human. Springer-Verlag, New York. p. 3–4.

Honigberg, B. M. 1963. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J. Protozool.*, **10**:20–63.

Honigberg, B. H. & Brugerolle, G. 1989. Structure. *In:* Honigberg, B. M. (ed.), Trichomonads Parasitic in Humans. Springer-Verlag, New York. p. 5–35.

Honigberg, B. M., Mattern, C. F. T. & Daniel, W. A. 1968. Structure of *Pentatrichomonas hominis* (Davaine) as revealed by electron microscopy. *J. Protozool.*, **15**:419–430.

Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, **17**:754–755.

Keeling, P. J., Poulsen, N. & McFadden, G. I. 1998. Phylogenetic diversity of parabasalian symbionts from termites, including the phylogenetic position of *Pseudotrypanosoma* and *Trichonympha*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **45**:643–650.

Kolisko, M., Silberman, J. D., Cepicka, I., Yubuki, N., Takishita, K., Yabuki, A., Leander, B. S., Inouye, I., Inagaki, Y., Roger, A. J. & Simpson, A. G. B. 2010. A wide diversity of previously undetected relatives of diplomonads isolated from marine/saline habitats. *Environ. Microbiol.*, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02239.x.

Lavier, G. 1936a. Sur Quelques flagellésintetinaux de poisson marins. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, **14**:278–289.

Lavier, G. 1936b. Sur un Trichomonadidé libre des eaux stagnantes. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, **14**:359–368.

Nie, D. 1950. Morphology and taxonomy of the intestinal protozoa of the Guinea-pig, *Cavia porcella*. *J. Morphol.*, **86**:381–493.

Ohkuma, M., Saita, K., Inoue, T. & Kudo, T. 2007. Comparison of four protein phylogeny of parabasalian symbionts in termite guts. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **42**:847–853.

Park, J. S., Kolisko, M., Heiss, A. A. & Simpson, A. G. B. 2009. Light microscopic observations, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Hicanonectes teleskopos* n. gen., n. sp., a deep-branching relative of diplomonads. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **56**:373–384.

Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **17**:208–212.

Posada, D. & Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**:817–818.

Simpson, A. G., Roger, A. J., Silberman, J. D., Leipe, D. D., Edgcomb, V. P., Jermiin, L. S., Patterson, D. J. & Sogin, M. L. 2002. Evolutionary history of ''early-diverging'' eukaryotes: the excavate taxon *Carpediemonas* is a close relative of *Giardia*. *Mol. Biol. Evol.*, **19**:1782–1791.

Stark, D. J., Beebe, N., Marriott, D., Ellis, J. T. & Harkness, J. 2006. Dientamoebiasis: clinical importance and recent advances. *Trends Parasitol.*, **22**:92–96.

Tachezy, J., Tachezy, R., Hampl, V., Šedinová, M., Vaňáčová, Š., Vrlík, M., van Ranst, M., Flegr, J. & Kulda, J. 2002. Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **49**:154–163.

Yamin, M. A. 1979. Flagellates of the orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grasse, and Hypermastigida Grassi and Foá reported from lower termites (Isoptera Families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach *Cryptocercus* (Dictyoptera, Cryptocercidae). *Sociobiology*, **4**:3–119.

Yubuki, N., Inagaki, Y., Nakayama, T. & Inouye, I. 2007. Ultrastructure and ribosomal RNA phylogeny of the free-living heterotrophic flagellate *Dysnectes brevis* n. gen., n. sp., a new member of the Fornicata. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **54**:191–200.

Received: 04/19/10, 07/16/10; accepted: 07/24/10