

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra parazitologie

Studijní obor: Biologie

Studijní program: Parazitologie



Bc. Jitka Vlasáková

Diverzita rodu *Monocercomonoides*

Diversity of the genus *Monocercomonoides*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Vladimír Hampl, PhD.

Konzultant: Doc. RNDr. Ivan Čepička, PhD.

Praha 2014

Prohlášení:

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

V Praze dne 14. srpna 2014

Jitka Vlasáková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli Mgr. Vladimíru Hamplovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce. Dále bych ráda poděkovala doc. Ivanu Čepičkovi za jeho rady a pomoc při výrobě protargolových preparátů, M.Sc. Sebastianu Treitlimu za pomoc při PCR, Mgr. Pavle Smejkalové taktéž za pomoc při PCR a poskytnutí fotografií a všem ostatním členům naší laboratoře Evoluční protistologie za podporu a vytvoření příjemného prostředí.

Abstrakt

Oxymonády (Excavata, Preaxostyla) jsou skupinou anaerobních endobiotických bičíkovců žijících především ve střevě xylofágního hmyzu (švábi, termiti). V případě rodu *Monocercomonoides* náležícího do morfologicky nejjednodušší čeledi Polymastigidae jsou popsány i druhy z obratlovců. Jedná se o skupinu protist, u které dosud nebyla prokázána přítomnost mitochondrie. V této práci jsme osekvenovali gen pro SSU rRNA dvou kmenů rodu *Monocercomonoides* a provedli fylogenetickou analýzu oxymonád. Pět vybraných kmenů z různých hostitelů, vzájemně poměrně vzdálených na fylogenetickém stromu, jsme studovali morfologicky pomocí světelné (DIC a protargolové barvení) a transmisní elektronové mikroskopie. Cílem morfologického studia bylo najít znaky, ve kterých se kmeny liší. Zaměřili jsme se zejména na morfologii jádra, uspořádání endoplazmatického retikula, strukturu fibrily R1 a rozměry buněk. Vybrané kmeny jsme byli schopni rozlišit podle polohy karyosomu (centrální nebo parietální) a počtu mikrotubulů ve fibrile R1 (6-12) a domníváme se, že představují různé druhy. Kmen NAU3 byl fylogenetickou pozicí a vzhledem buňky natolik odlišný, že se může jednat dokonce o nový rod. V žádném kmeni jsme nepozorovali mitochondrii nebo jí příbuznou organelu.

Klíčová slova: Oxymonády, *Monocercomonoides*, SSU rRNA, fylogeneze, transmisní elektronová mikroskopie, světelná mikroskopie, protargol

Abstract

Oxymonads (Excavata, Preaxostyla) are a group of anaerobic endobiotic flagellates living primarily in guts of xylophagous insects (cockroaches and termites). Some representatives of the genus *Monocercomonoides* belonging to the morphologically simplest family Polymastigidae have been described also from the guts of vertebrates. Oxymonads are a group of protist in which mitochondrion has not been proven yet. In this work, we have sequenced gene for SSU rRNA of two strains of *Monocercomonoides* and performed phylogenetic analysis of oxymonads. Five selected strains *Monocercomonoides* isolated from different hosts and distantly related on the phylogenetic tree were studied by using light (DIC and protargol staining) and transmission electron microscopy. The aim was to find differences between these strains. We have focused primarily on the morphology of the nucleus, appearance of the endoplasmic reticulum and structure of the fibre R1. We were able to distinguish the strains by the position of karyosome (central and parietal) and the number of microtubules in the R1 fibre (6-12) and we assume that they represent separate species. The phylogenetic position and appearance of the strains NAU3 were so different that it may represent a new genus. Mitochondria or double-membrane bounded organelles have not been observed in any strain.

Keywords: Oxymonads, *Monocercomonoides*, SSU rRNA, phylogeny, transmission electron microscopy, light microscopy, protargol

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
1. Literární přehled.....	8
1.1. Charakteristika oxymonád	8
1.2. Taxonomie oxymonád.....	8
1.2.1. Polymastigidae	9
1.2.2. Čeleď Streblomastigidae	11
1.2.3. Čeleď Oxymonadidae	11
1.2.4. Čeleď Saccinobaculidae.....	12
1.2.5. Čeleď Pyrsonymphidae	12
1.2.6. <i>Opisthomitus</i> Duboscq a Grassé.....	13
1.3. Diverzita rodu <i>Monocercomonoides</i>	13
2. Cíle práce.....	15
3. Materiál a metody.....	16
3.1. Původ zkoumaných kmenů	16
3.2. Složení a příprava používaných médií	16
3.2.1. Dobell – Leidlaw (1926), modifikováno.....	16
3.2.2. SOC médium	17
3.2.3. Tekuté LB broth médium.....	17
3.2.4. Pevné LB broth médium.....	18
3.3. Kultivace oxymonád	18
3.4. Izolace DNA	18
3.5. Amplifikace genu pro SSU rRNA.....	18
3.6. Elektroforéza amplifikované DNA	21
3.7. Purifikace PCR produktů.....	21
3.8. Klonování.....	21
3.8.1. Ligační směs pro klonování	21
3.8.2. Colony PCR a izolace plazmidů	22
3.9. Sekvence DNA	22
3.10. Skládání sekvencí.....	23
3.11. Morfologie a ultrastruktura	23
3.11.1. Pozorování světelným mikroskopem	23
3.11.2. Měření buněk	24

3.11.3. Pozorování pomocí transmisního elektronového mikroskopu	24
4. Výsledky.....	25
4.1. Molekulární fylogenetika	25
4.2. Morfologické znaky	26
4.2.1. Morfometrie.....	26
4.2.2. Světelná mikroskopie	28
4.2.3. Elektronová mikroskopie.....	32
4.2.4. Celkový vzhled buněk.....	41
4.2.5. Karyosom.....	41
4.2.6. Fibrila R1.....	41
4.2.7. Mitochondrie.....	41
5. Diskuze	43
5.1. Sekvence genu pro SSU rRNA.....	43
5.2. Molekulární fylogenetika	43
5.3. Morfometrie.....	44
5.4. Morfologická studie	44
5.5. Druhy <i>Monocercomonoides</i>	45
6. Závěry	47
7. Seznam zkratek	48
8. Seznam literatury	49

1. Literární přehled

1.1. Charakteristika oxymonád

Třída *Oxymonadida* (Grassé, 1952) je skupinou anaerobních či mikroaerofilních endobiontních bičíkovců. Výživa těchto prvoků je heterotrofní a jejich přirozené životní prostředí je zadní střevo především xylofágního hmyzu, hlavně švábů a termitů, kde jsou spolu s dalšími mikroorganismy důležitou součástí jejich střevního obsahu (Radek R., 1994). Někteří zástupci rodu *Monocercomonoides* se však vyskytují i u obratlovců (Kulda a Nohýnková, 1978). V životním cyklu oxymonád převažuje jako životní stádium trofozoit. Tato buňka ovoidního, někdy spirálně zkrouceného tvaru nese obvykle čtyři bičíky oddělené do dvou párů, přičemž jeden z nich je většinou částečně adhezaný na buňku a zpětný. Karyomastigont oxymonád je tvořen jádrem, obvykle čtyřmi kinetosomy, axostylem a preaxostylem. Axostyl probíhající buňkou jako její podélná osa není dutý jako u parabasalidů, ale je tvořen řadami mikrotubulů přiloženými těsně k sobě. U některých zástupců může být kontraktilní a podílet se na charakteristickém pohybu buňky (Brugerolle a Müller, 2000). Jeho pohyblivost je zřejmě zajištěna vzájemným klouzáním mikrotubulů díky dyneinovým molekulám a za spotřeby ATP (Bloodgood a kol., 1974). Některé rody, např. *Microrhopalodina*, mají zmnožené bičíky a jádra (Radek, 1994; Brugerolle a Lee, 2002).

U těchto prvoků nenalezneme eukaryotní výbavu jako Golgiho aparát, peroxisomy, mitochondrie, ani cytostom. U sesterkého rodu *Trimastix* mitochondrie ultrastrukturně i geneticky prokázána byla (Brugerolle a Patterson, 1997; Simpson a kol., 2000) Oxymonády se vyživují fagotrofií a pinocytózou, přičemž ty větší druhy pohlcují částičky dřeva a jsou tak zapojeny do procesu trávení celulózy (Radek, 1994). Menší rody např. *Monocercomonoides* se živí bakteriemi. Bakterie vyskytující se na jejich povrchu náleží do řádů *Spirochaetes* a *Bacteroidales* (Noda a kol., 2006; Hongoh a kol., 2007). Některé druhy mají vyvinuté mikrotubulární rostellum nebo mikrofibrilární "holdfast", které slouží buňce k přichycení ke střevní stěně hmyzího hostitele. Zásobní látkou je glykogen.

Oxymonády se dělí binárním dělením. Mitóza je uzavřeného typu s intracelulárním dělicím vřeténkem (Hasmann a Hülsmann, 2003). U některých zástupců rodu *Saccinobaculus*, *Notila* a *Paranotila* bylo pozorováno sexuální rozmnožování zahrnující meiózu, tvorbu gamet nebo gametických jader a vznik zygoty (Lee a kol., 2000). Během tvorby zygoty splývají kromě jader i axostyly (Hausmann a Hülsmann, 2003). Meióza oxymonád zahrnuje pouze jedno redukční dělení, kdy z jedné buňky vzniknou pouze dvě buňky dceřinné namísto dvou redukčních dělení a vzniku čtyř buněk, jak je tomu u ostatních eukaryot (Cleveland, 1950; Dacks a kol., 2001). Sexuální proces je asociovaný se svlékacím cyklem hostitele, k reinfekci dochází pozřením výkalů nebo přenosem cyst. Jejich tvorba byla pozorována např. u rodů *Sauromonas* a *Saccinobaculus* (Lee a kol., 2000).

1.2. Taxonomie oxymonád

Molekulární data poukazují na silný příbuzenský vztah oxymonád k exkavátnímu volně žijícímu rodu *Trimastix* (Dacks a kol., 2001). S tímto rodem společně náleží do skupiny Preaxostyla. Jméno tohoto taxonu je odvozeno od synapomorfního znaku trimastixe a oxymonád. Rod *Trimastix* má ve svém karyomastigontu fibrilu I, která podkládá pravou

stranu břišní rýhy a tato fibrila identické stavby je přítomna i u oxymonád, kde je součástí parakrystalinní struktury preaxostylu (Simpson a kol., 2002). Preaxostyla bývají řazena s dalšími skupinami Parabasala a Fornicata do taxonu Metamonada (Cavalier-Smith, 2003).

Je popsáno zhruba 150 druhů oxymonád (Hampl V., osobní sdělení), které jsou klasifikovány do pěti čeledí (Lee a kol., 2000): Polymastigidae, Streblomastigidae, Saccinobaculidae, Oxymonadidae a Pyrsonymphidae. Příbuzenské vztahy mezi skupinami oxymonád nejsou příliš prozkoumány. Většina druhů byla popsána pouze na základě morfologických znaků a nejsou známy jejich sekvence (Radek a kol., 2014). Je však známo a dobře podpořeno vysokou bootstrapovou hodnotou, že rody *Monocercomonoides* a *Streblomastix* tvoří jeden klád (Heiss a Keeling, 2006; de Konig a kol., 2008). Monofylie čeledí je také dobře podpořena vyjma čeledi Polymastigidae (Šrámová, 2012). Níže následuje krátká charakteristika jednotlivých čeledí.

1.2.1. Polymastigidae

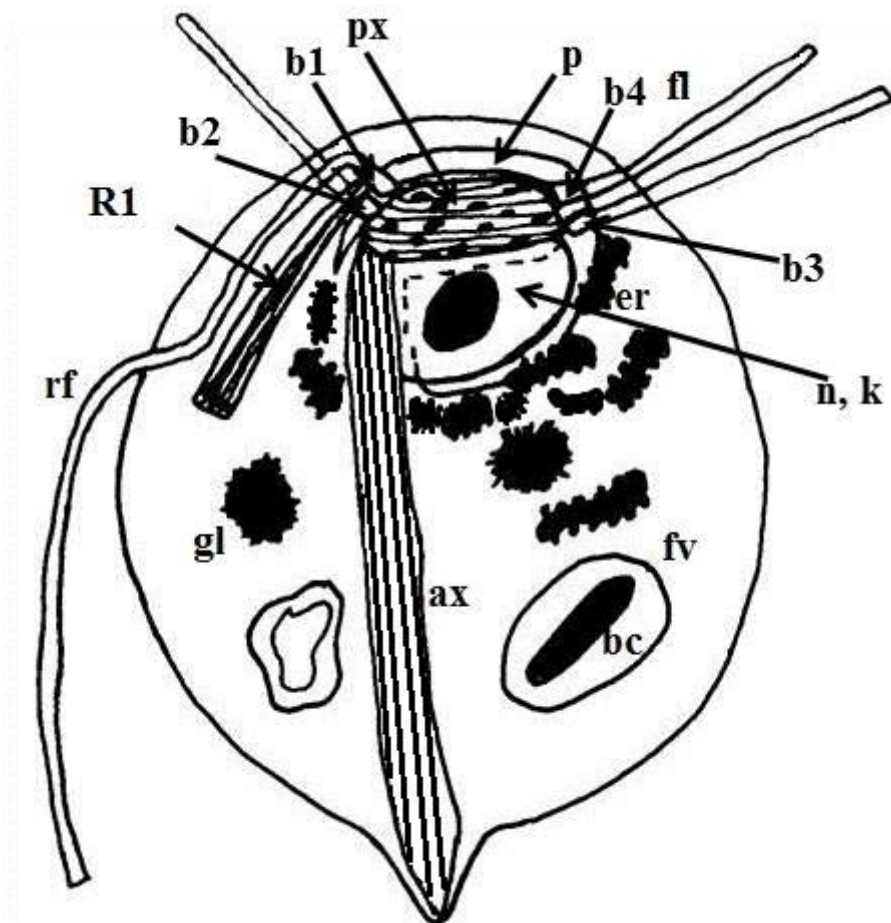
Morfologie zástupců této čeledi je považována za pleziomorfní (Lee a kol., 2000). Tito drobní bičíkovci nesou čtyři bičíky oddělené do dvou párů, z nichž jeden je zpětný. Jádrem je umístěno anteriorně a je obklopeno jednoduchou vrstvou mikrotubulů nazývaných pelta. Buňky mají tenký nekontraktilní axostyl (Radek, 1994; Lee a kol., 2000). Náleží sem tři rody: *Polymastix*, *Monocercomonoides* a *Paranotila*.

Monocercomonoides Travis (Obr. 1)

Bazální tělísko zpětného bičíku je označováno jako B1 a druhé umístěné v jeho blízkosti jako B2. Druhý pár bazálních tělísek je označován jako B3 a B4 (Radek, 1994). Oba páry tělísek spojuje tzv. preaxostyl tvořený dvěma vrstvami. První vrstvou přivrácenou k jádru je jedna řada mikrotubulů. Druhá vrstva je parakrystalinní a nemikrotubulární fibrila I (Simpson a kol., 2002). V oblasti preaxostylu se vyskytuje velké množství glykogenových granulí. Některé mikrotubuly z preaxostylu se na úrovni jádra přidávají k další mikrotubulární struktuře – axostylu, což je několik podélných řad vzájemně spojených mikrotubulů. Axostyl prochází podélně za jádrem celou buňkou jako její osa až k posteriornímu konci, tam může vytvářet výběžek, je však stále obalen cytoplazmatickou membránou (Hausmann a Hülsmann, 2003, Lee a kol., 2003). V blízkosti bazálních tělísek 1 a 2 se vyskytují mikrotubulární kořeny označované jako R1 a R2. Mikrotubulární kořen R1 je ve starší literatuře někdy nazýván funis a podkládá zpětný bičík, jež částečně adhezuje k povrchu buňky. Na druhé mikrotubulární tělísko je napojena pelta, jednoduchá vrstva mikrotubulů obklopující jádro (Radek, 1994). Jádrem je sférické, umístěné v anteriorní části a obsahuje karyosom (Radek, 1994).

Zástupci tohoto rodu žijí ve střevě larev tiplic a ve švábech. Mnoho druhů také žije v trávicím traktu obratlovců, např. dobytka, plazů, obojživelníků (Kulda a Nohýnková, 1978).

Obr. 1. Schéma buňky zástupce rodu *Monocercomonoides*, čerpáno z Kulda a Nohýnková, 1978 a Radek, 1994, (n – jádro, k – karyosom, px – preaxostyl, p – pelta, b1, b2, b3, b4 – bazální tělíska, R1 – fibrila R1, ax – axostyl, er – endoplazmatické retikulum, gl – glykogen, fv – potravní vakuola, bc – bakterie).



Polymastix Bütschli

Buňky zástupců rodu *Polymastix* jsou mandlovitého či vřetenovitého tvaru se čtyřmi volnými bičíky oddělenými do dvou párů, nemají však adhezující zpětný bičík (Brugerolle, 1980). Jádro je umístěno anteriorně a obsahuje posteriorně uložený karyosom. Pelta je redukována a tenký nekontraktilní axostyl nevybíhá z buňky. Povrch buňky je pokryt tyčinkovitými bakteriemi rodu *Fusiformis*. Žijí ve střevě brouků, v larvách hmyzu, tiplic a v mnohožkách (Lee a kol., 2000).

Paranotila Cleveland

Dosud byl popsán pouze jeden druh, a to *Paranotila lata* ze švába *Cryptocercus punctulatus* (Cleveland, 1966). Buňka této oxymonády je delší než u rodu *Monocercomonoides*. Čtyři bičíky jsou směřovány dozadu, axostyl nevybíhá a není kontraktilní. Ve velkém jádře jsou uloženy dva karyosomy, které leží v jeho přední části. U tohoto rodu se vyskytuje pohlavní cyklus, kdy buňka podstupuje gametogenezi, vzniká 8 samčích a 8 samičích pronukleů. Jejich

fúzí vzniká zygotické jádro a následné dělení dá vznik 8 diploidním buňkám (Cleveland, 1966).

1.2.2. Čeleď *Streblomastigidae*

Dosud jediným popsáním zástupcem této čeledi je druh *Streblomastix strix* (Kofoid a Swezy, 1919) žijící ve střevě termitů rodu *Zootermopsis*. Vřetenovitá buňka tohoto druhu je dlouhá, může dosáhnout rozměru až 530 μm (Brugerolle a Lee, 2002). Povrch buňky je zvlněn do 4 až 8 spirálních hlubokých záhybů. Čtyři nepřiléhající bičíky jsou uloženy na bázi přichycovací struktury “holdfast”. Axostyl začíná jako několik kompaktních řad mikrotubulů a v zadní části přechází ve volný svazek (Lee a kol., 2000).

1.2.3. Čeleď *Oxymonadidae*

Některé oxymonády patřící do této čeledi mohou mít zmnožená jádra a karyomastigonty (Brugerolle a Lee, 2002). Tato čeleď zahrnuje 4 rody: *Oxymonas*, *Barroella*, *Microrhopalodina* a *Sauromonas*.

Oxymonas Janicki

Buňka kyjovitého tvaru nese čtyři bičíky oddělené do dvou párů. V přední části je vytvořeno vysunovatelné rostellum. Na jeho konci je vyvinutý “holdfast” obsahující mikrofibrily (Brugerolle a König, 1997). Nepřichycené buňky se pohybují ve střevním obsahu a jejich rostellum je redukováno. Jádro umístěné anteriorně se nachází pod bázi rostella (Lee a kol., 2000). Je však popsán druh *Oxymonas jouteli* získaný z *Neotermes jouteli*, který nemá vůbec přítomné rostellum (Radek a kol., 2014). Mohutný axostyl složený z mnoha řad mikrotubulů začíná na bázi rostella a vybíhá na posteriorním konci buňky. Všechny popsané druhy žijí v termitech čeledi Kalotermitidae (Brugerolle a König, 1997; Lee a kol., 2000).

Barroella Zelif

Tento rod oxymonád má vyvinuté rostellum, zmnožená jádra a axostyly. Jader může být přítomno 2 až 114 (Brugerolle a Lee, 2002). Axostyly jsou roztroušeny po celé buňce. Přichycené buňky jsou bezbičíkaté, dceřinné buňky vzniklé plazmotomií mají bičíky krátké. Fagocytují částičky dřeva. Dosud jsou známy dva druhy získané z *Calcaritermes brevicollis* a z *Neotermes howa* (Cross, 1946).

Microrhopalodina Grassi & Foa

V mnohojaderných buňkách nálevkovitého tvaru je na bázi rostella umístěno několik karyomastigontů s bičíky. Buňka uvolněná ze střevního epitelu ztrácí rostellum (Lee a kol., 2000).

Sauromonas Grassé & Hollande

Buňka této oxymonády má jeden karyomastigont, jehož organizace je uspořádáním podobná rodu *Oxymonas*. Když u jeho hostitele *Glyptotermes boukoko* probíhá proces svlékání, buňka *Sauromonas* podstupuje sérii transformací, kdy se bičíkovec uvolní od střevní stěny a zmnoží se jeho bičíky. Při přechodu ze zmnožených bičíků do základního čtyřbičíkatého stavu se

tvorí cysty (Lee a kol., 2000). Je popsán jeden druh *Sauromonas m'baikiensis* z termita *Glyptotermes boukoko*. Životní cyklus této oxymonády není kompletně znám (Grassé PP., 1952).

1.2.4. Čeleď Saccinobaculidae

Zástupcům této čeledi přiléhají bičíky v přední části k buňce. Axostyl těchto oxymonád je kontraktilní a nemají vyvinutý přichycovací aparát. U těchto bičíkovců je znám pohlavní cyklus. Do této čeledi náleží dva rody, *Saccinobaculus* a *Notila*. (Cleveland, 1950).

Rod *Saccinobaculus* Cleveland

Buňka hruškovitého tvaru nese v přední části čtyři bičíky směřující dozadu, které však přiléhají k buňce jen v proximální části. Povrch buňky je pokryt drobnými póry (Lee a kol., 2000; Heiss a Keeling, 2006). Buňka může nést 4, 8 až 12 bičíků, ale ty se zřejmě na jejím pohybu příliš nepodílí. Převážná část pohybu je vykonávána axostylem. Tato fibrila složená až z 60 řad mikrotubulů je kontraktilní, unduluje v různých frekvencích a amplitudách, což způsobuje charakteristický pohyb tohoto bičíkovce, který je přirovnáván k pohybu „hada v pytli“. Tento fakt může být ovlivněn i tím, že na rozdíl od jiných rodů povrch této oxymonády není pokryt ektobiotickými bakteriemi, což umožňuje variabilitu tvaru buňky (Carpenter a kol., 2008). Jelikož není přítomen přichycovací aparát, plavou buňky volně ve střevním obsahu. Tento rod je schopen tvořit cysty sloužící k přenosu na dalšího hostitele. Sexuální proces je závislý na svlékacím cyklu hostitele a zahrnuje gametogenezi, meiózu a splývání buněk (Cleveland, 1950). Jsou popsány tři druhy, *S. minor*, *S. ambloaxostylus* a *S. dorooxostylus*. V posledním jmenovaném druhu byla pozorována elektron-denzní organela obalená jednou nebo dvěma membránami – případná mitochondrie (Carpenter a kol., 2008).

Rod *Notila* Cleveland

Čtyři bičíky adherují k povrchu buňky v jejich proximální části. Axostyl je kontraktilní, ale na rozdíl od předchozího rodu nevybíhá z buňky. Bičíkovec se rozmnožuje asexuálně v období mezi svlékáním hostitele. Sexuální proces probíhá při svlékání a zahrnuje gametogenezi, splývání buněk, meiózu a splývání gametických jader v jedné buňce. Jediný známý druh *Notila proteus* byl popsán ze střeva hostitele *Cryptocercus punctulatus* (Cleveland, 1966; Lee a kol., 2000).

1.2.5. Čeleď Pyrsonymphidae

Těmto oxymonádám přiléhají bičíky k celé délce buňky a jejich axostyl je kontraktilní. Mikrofibrilární „holdfast“ je vytvořen. Fagocytují částičky dřeva a bakterie, živí se také pinocytozou. Náleží sem dva rody, *Pyrsonympha* a *Dinenympha* (Duboscq a Grassé, 1925). O validitě těchto rodů se dlouho vedly spory. Leidy, Duboscq a Hollande (*Leidy, 1881; Duboscq a Grassé, 1925) se domnívali, že *Pyrsonympha* má ve svém životním cyklu dvě formy. Mladá menší pentlicovitá buňka vyskytující se volně ve střevním obsahu nesoucí čtyři bičíky byla nazývána „Dinenymphou“. Velká pyriformní forma přichycená k epitelu střeva nesoucí osm bičíků se nazývala „Pyrsonympha“. Pomocí metody FISH a fylogenetické analýzy však bylo zjištěno, že se nejedná o dva morfotypy jednoho organismu, ale o různé organismy nyní řazené do různých rodů (Moriya a kol., 2003; Stingl a Brune, 2003).

Rod *Pyrrsonympha* Leidy

Bičíkovci mají tělo hruškovitého tvaru. Axostyl je kontraktilní. Buňka některých druhů může dosáhnout až 150 μm (Moyria a kol., 2003, Lee a kol., 2000). „Holdfast“ je vytvořen. V axonemě bičíků jsou podél čtyř vně orientovaných doubletů přítomny paraxonemální žíhané fibrily (Lee a kol., 2000). Axostyl je složený až z 50 řad mikrotubulů a vybíhá v posteriorní části. Tvorba cyst nebyla pozorována, k reinfekci termita dochází požitím výkalů. Je popsáno 14 druhů žijících v rektálním váčku termitů rodu *Reticulitermes* (Hampl V., osobní sdělení)

Rod *Dinenympha* Leidy

Bičíkovci tohoto rodu jsou podlouhlé buňky dosahující velikosti max. 35 μm a pohybující se volně ve střevní tekutině. „Holdfast“ není vytvořen. Druh *D. fimbriata* je pokryt velkým množstvím epibiotických bakterií a obsahuje ve své cytoplazmě dřevní částice. Naopak u druhu *D. gracilis* je přítomno málo epibiotických bakterií a nebylo pozorováno částečky dřeva v cytoplazmě (Stingle a Brune, 2003).

1.2.6. *Opisthomitus* Duboscq a Grassé

Posledním dobře popsaným rodem oxymonády je *Opisthomitus*, který má zajímavou historii. Tento rod byl vytvořen v roce 1934 Duboscqem a Grassém a popsali jej z termita *Kaloterme flavicollis* (Duboscq a Grassé, 1934). Po dlouhou dobu byl řazen do taxonu Parabasala na základě přítomnosti krátkého parabazálního aparátu. Později však bylo zjištěno, že parabazálním aparátem byl chybně označen preaxostyl (Radek a kol., 2014), přesto došlo k přeřazení rodu *Opisthomitus* do třídy Oxymonadida Brugerollem a Leem až v roce 2000 (Brugerolle a Lee, 2000). Co se jeho taxonomie týče, na základě morfologických znaků by mohl být řazen do čeledi Polymastigidae díky přítomnosti mikrotubulárních kořenů R1 a R2. Molekulární analýza však podporuje sesterský vztah tohoto rodu k čeledi Pyrrsonymphidae (Radek a kol., 2014).

Co se týče morfologických znaků, jeho buňka nese čtyři bičíky oddělené do dvou párů. Jeden z bičíků je zpětný a podložený fibrilou R1. V přední části buňky je vytvořen tzv. „lappet“ (lalok). Tato pravděpodobně permanentní struktura se liší od rostella tím, že obsahuje malá granula, vrstvu mikrotubulů pelty a malou stuhu mikrotubulů R2. Buňky přichycené ke střevní stěně ale nebyly pozorovány. Jsou popsány dva druhy, *O. avicularis* z hostitele *Kaloterme flavicollis* a *O. longiflagellatus* z *Neoterme jouteli* (Radek a kol., 2014).

1.3. Diverzita rodu *Monocercomonoides*

Nyní se na pár řádků vrátím k rodu *Monocercomonoides*, protože tato oxymonáda je hlavním tématem této práce. Celkem je popsáno zhruba 50 druhů tohoto rodu (Hampl V., osobní sdělení). Validita některých z nich je však sporná. Zhruba 15 druhů bylo popsáno ze savců, a to především z hlodavců. Z plazů bylo popsáno 5 druhů, nejvěrohodnější z nich je však druh *M. lacertae*, kterého Moskowitz (Moskowitz, 1951) považuje za jediný validní druh z plazů. Zbývající druhy byly popsány z bezobratlých, a to ze švábů, larev brouků a tiplic (*Grassé, 1926). Jeden druh byl popsán z krtonožky (Rao, 1969).

Popisy druhů jsou založeny převážně na rozměrech buňky, jádra, bičíků a znaků viditelných po obarvení Giemsou, protargolem či haematoxylinem. Mezi tyto znaky patří morfologie jádra, počet a délka předních a zadních bičíků, počet fibril R1 a rozměry buněk. Při popisování druhů byl kladen také velký důraz na hostitele, protože mnoho autorů počítalo s úzkou hostitelskou specifitou. Většině studií chybí elektronová mikroskopie a nejsou známy sekvence. Jediná sekvence publikovaná v zahraničním časopise je sekvence námi pěstovaného kmene PA203 (HAMPL a kol. 2005). Deset dalších sekvencí bylo publikováno v diplomové práci Elišky Šrámové (Šrámová, 2012).

2. Cíle práce

- U vybraných kultur osekvenovat gen pro SSU rRNA a prohloubit tak informace o příbuzenských vztazích kmenů rodu *Monocercomonoides*.
- Porovnat morfologii a ultrastrukturu vybraných kultur rodu *Monocercomonoides* pocházejících z různých hostitelů pomocí světelné a transmisní elektronové mikroskopie s cílem nalézt znaky, které tyto kmeny odlišují.
- Pátrat po přítomnosti dvoumembránových organel – homologů mitochondrie.

3. Materiál a metody

3.1. Původ zkoumaných kmenů

Zkoumané kmeny pochází ze zavedených kultur oxymonád kultivovaných v naší laboratoři. Kultury MAREK2, VAV1B, NAU1 a NAU3 jsme získali od Doc. Ivana Čepičky a Mgr. Pavly Smejkalové. Všechny kmeny jsou stále udržovány v kulturách a přeočkovávají se pravidelně jednou za týden do dvoufázového modifikovaného média Dobell – Leidlaw (1926). Kmeny byly získány především ze střevního obsahu různých živočichů (bezobratlí i obratlovců). Kultury VAV1B a MAREK2 pocházejí z dlouhodobě nepoužívaných septiků. Tabulka 1 obsahuje informace ke kmenům používaným v této práci. Původ ostatních kmenů, jejichž sekvence jsme použili pro fylogenetickou analýzu, je uveden v diplomové práci Elišky Šrámové (Šrámová, 2012).

Tab. 1. Studované kmeny

Kmen	Hostitel/lokalita	Izolátor
TENE79	<i>Testudo marginata</i>	Čepička
POTCUPRI	<i>Potosia cuprina</i>	Smejkalová
VAV1B	septik prof. Vávry	Čepička
MAREK2	septik dr. Eliáše	Čepička
NAU1, NAU3	<i>Nauplieta</i> sp.	Smejkalová

3.2. Složení a příprava používaných médií

3.2.1. Dobell – Leidlaw (1926), modifikováno

Toto médium se skládá z pevné a tekuté fáze. Obě tyto složky byly připravovány odděleně a zkompletovaly se až před použitím. Pevná složka sestává z 1,5 ml koňského séra, které koagulovalo v šikmo položených skleněných zkumavkách (či plastových falkonách) v horkovzdušném sterilizátoru 1 hodinu při 80°C. Následně byly ještě 2x vždy po 24 hodinách pasterizovány stejným postupem. Zkumavky s takto připravenou fází byly skladovány v lednici. Tekutá složka obsahuje 500 ml Ringerova roztoku a 50 ml sterilně odebraného vaječného bílku. Ringerův roztok je složen z roztoků A a B (Tab. 2).

Tab. 2. Složení Ringerova roztoku.

Roztok A	
NaCl (Sigma)	6,5 g
NaHCO ₃ (Sigma)	0,2 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (Sigma)	0,14 g
destilovaná voda	do 900 ml
Roztok B	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (Sigma)	0,16 g
destilovaná voda	do 100ml

Roztoky A a B jsou připravovány a autoklávovány odděleně. Díky tomu nedojde k vysrážení fosfátu v přítomnosti chloridu vápenatého. Po jejich zchladnutí byly sterilně zkompletovány. Poté se do Ringerova roztoku přidalo 50 ml sterilně odebraných vaječných bílků. Tato tekutá fáze byla uchovávána ve skleněné láhvi v lednici. Před použitím byla pevná fáze převrstvena 3 ml tekuté složky.

3.2.2. SOC médium

SOC médium se používalo jako živné médium pro bakterie při klonování.

Tab. 3. Složení SOC média.

Bacto – trypton (Oxoid)	2 g
Bacto – yeast extract (Oxoid)	0,5 g
1M NaCl (Sigma)	1 ml
1M KCl (Sigma)	250 µl
2M Mg ²⁺ sterilní zásobní roztok	1 ml
2M sterilní glukóza (Sigma)	1 ml

Zásobní roztoky na SOC médium:

2M Mg²⁺ roztok 20,33g MgCl₂.6H₂O (XXX) + 24,65g MgSO₄.7 H₂O (XXX) do 100 ml vody- sterilizováno filtrací

1M NaCl (Mw=58,44): 2,9 g do 50 ml vody

1M KCl (Mw=74,5513): 3,7 g do 50 ml vody

2M glukóza (Mw=180,16): 9 g do 50 ml vody – sterilizováno filtrací

Do kultivační láhve byl přidán Bacto-trypton, Bacto-yeast extract, 1M NaCl, 1M KCl a 97 ml destilované vody. Roztok byl následně autoklávován, po jeho zchladnutí byl přidán sterilní zásobní roztok Mg²⁺ a sterilní glukóza. Roztok byl doplněn 100 ml destilované vody s výsledným pH 7. Poté byl roztok rozplněn do sterilních mikrozkušavek po 1 ml a skladován v mrazničce při -20°C.

3.2.3. Tekuté LB broth médium

Médium bylo použito jako živné médium pro bakterie při klonování.

Tab. 4. Tekuté LB broth médium.

LB broth (Sigma)	10 g
destilovaná voda	do 500 ml

Prášek LB broth byl přidán do kultivační láhve a byl rozpuštěn destilovanou vodou do určeného objemu. Poté byl roztok autoklávován.

3.2.4. Pevné LB broth médium

Jedná se o směs LB broth a agaru na Petriho miskách. Médium bylo použito jako pevné živné médium pro kolonie bakterií.

Tab. 5. Pevné LB broth médium.

LB broth (Sigma)	10 g
Agar	6 g
destilovaná voda	do 500 ml

Prášek LB broth byl rozpuštěn v destilované vodě, poté byl do roztoku přidán bakteriologický agar. Médium bylo sterilizováno v autoklávu, po mírném zchladnutí bylo sterilně rozplněno do Petriho misek po 25 ml. Takto připravené médium se skladovalo v lednici.

3.3. Kultivace oxymonád

Nejdříve bylo třeba zkompletovat pevnou a tekutou složku média Dobell – Leidlaw (1926), tudíž jsme převrstvili koagulované koňské sérum 3 ml tekuté fáze. Do takto připravené zkumavky jsme sterilní Pasteurovou pipetou inokulovali 0,5-1 ml kultury. Vždy byla odebrána kapka na podložní sklíčko a zkontrolovali jsme stav kultury pod světelným mikroskopem za použití fázového kontrastu nebo Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu. Tento proces byl opakován každý týden. Zbytek staré kultury mohl být použit pro izolaci DNA, pozorování živých buněk či k přípravě trvalých preparátů. Kultury byly uchovávány při pokojové teplotě.

3.4. Izolace DNA

Z požadované kultury jsme odebrali 1,5 ml vzorku do mikrozkuavky a centrifugovali 5 min při 3000 g. Supernatant jsme odpipetovali a pelet resuspendovali přidáním 200 μ l sterilního PBS. K následné izolaci DNA byl použit kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (50) (Qiagen) podle přiloženého protokolu Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol). Množství získané DNA bylo následně změřeno pomocí spektrofotometru (NanoDrop® ND-1000). V případě nízké koncentrace jsme DNA přečistili a koncentrovali pomocí kitu DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research) podle přiloženého protokolu.

3.5. Amplifikace genu pro SSU rRNA

Získanou DNA jsme amplifikovali pomocí metody PCR a primerů, kterými jsme získali část genu pro malou ribosomální podjednotku (SSU rRNA). Pro reakci jsme používali tyto polymerázy: Emerald Amp® MAX PCR Master Mix (TAKARA BIO INC.), PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (TAKARA BIO INC.) a LA polymeráza (5U/ μ l; Top-Bio). Všechny používané primery byly naředěny na koncentraci 10 pmol/ μ l. Používali jsme primery specifické pro oxymonády a také univerzální eukaryotické primery (Medlin A, B a EK). Amplifikační reakce jsme většinou připravovali do polovičního objemu, tj. 25 μ l.

Tab. 6. Použité univerzální eukaryotické primery.

Název použitého primeru	Sekvence použitého primeru 5' -->3'
Medlin A	AYC TGG TTG AYY TGC CAG
Medlin B	TGA TCC ATC TGC AGG TTC ACC T
EK-42F	CTCAARGAYTAAGCCATGCA
EK-1498R	CACCTACGGAAACCTTGTTA

Tab. 7. Použité specifické primery oxymonád.

Název použitého primeru	Sekvence použitého primeru 5' -->3'
MonSSUR	TCA CCT ACG GAA ACC TT
MonSSUF	GAA GTC ATA TGC TGT CTCAA
Mon577R	ACC GCG GCK GCT GGC
Mon577F	GCC AGC AGC CGC GGT
Mon590F	GCA GCA GGC GCG CAA ATT ACC C
Mon751R	CTA TTA GAG CTG GAA TTA CCG CGG C
Mon866R	CAT ACT YCC CCC AGA AC
Mon866F	GTT CTG GGG GRA GTA TG
Mon1300R	TAA TGT GRT CAG TAG CGA
Mon1510R	GGG CAT CAC AGA CCT G
Mon1510F	CAG GTC TCT GAT GCC C
Mon1889F	CTT AAA GAA ATT GAC GGA AGG GCA CC
Mon2028R	CTC CAC CAA CTA AGA ACG ACC ATG C

Tab. 8. Reakční směsi s Emerald Amp® MAX PCR Master Mix nebo PrimeSTAR® Max DNA Polymerase.

Master Mix (2x Premix)	12,5 µl
Primer F (Medlins či spec.)	1,25 µl
primer R (Medlins či spec.)	1,25 µl
DNA	5 µl
H ₂ O	doplnit do 25 µl

Tab. 9. Reakční směs s LA polymerázou (5U/μl).

H ₂ O	15 μl
LA pufr	2,5 μl
dNTP	0,75 μl
DMSO	0,5 μl
EK-42 F	1 μl
EK-1498 R	1 μl
DNA	4 μl
LA polymeráza (5U/ μl)	0,25 μl

Amplifikační reakce probíhaly v termocykleru při následujících teplotních cyklech:

Tab. 10. Teplotní cyklus s Emerald Amp® MAX PCR Master Mix.

Část cyklu	Počet	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	1 x	96°C	5 min
Denaturace	35 x	96°C	1 min
Annealing		55°C	1 min
Elongace		72°C	3 min
Závěrečná elongace	1 x	72°C	15 min

Tab. 11. Teplotní cyklus s PrimeSTAR® Max DNA Polymerase.

Část cyklu	Počet	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	1 x	98°C	4 min
Denaturace	35 x	98°C	0:10 min
Annealing		55°C	0:05 min
Elongace		72°C	0:15 min
Závěrečná elongace	1 x	72°C	5 min

Tab. 12. Teplotní cyklus s LA polymerázou (5U/μl.)

Část cyklu	Počet	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	1 x	94°C	1 min
Denaturace	30 x	94°C	0:15 min
Annealing		55°C	0:30 min
Elongace		68°C	4 min
Závěrečná elongace	1 x	68°C	15-30 min

3.6. Elektroforéza amplifikované DNA

Přítomnost požadovaného úseku DNA a jeho kvalita byla ověřena na horizontální elektroforéze. Připravili jsme 1% agarózový gel složený z 0,40g agarózy (Gibco) a 40ml TAE buffer (50X) Molecular biology grade (AppliChem). Tato směs byla umístěna do Erlenmayerovy baňky a přivedena k varu do úplného rozpuštění agarózy. Po následném ochlazení bylo přidáno 40 μ l SYBR safe (LifeTechnologies); tato látka zviditelňuje DNA. Gel byl nalit do plastové formy, v níž byl předem umístěn plastový hřebínek s počtem zubů odpovídající potřebnému počtu a tloušťce jamek. Gel tuhnul zhruba 20 minut. Poté se do první jamky napipetoval velikostní standard (GeneRuler, Fermentas), do ostatních jamek byly napipetovány naše vzorky. V případě použití polymerázy PrimeSTAR a LA polymerázy byl naneseo 5 μ l našeho vzorku do pipetovací destičky a k němu byl přidán 1 μ l Loading dye (Fermentas). Směs byla promíchána a poté naneseo do jamky na gelu. Elektroforéza probíhala zhruba 30 minut při napětí 100V (vzdálenost elektrod 10 cm). Gel byl poté vyfocen.

3.7. Purifikace PCR produktů

V případě přítomnosti pouze jednoho fragmentu jsme mikrozkuřavku s tímto vzorkem přečistili pomocí kitu DNA Clean & Concentrator (ZymoResearch) nebo High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) podle příloženého protokolu. DNA byla eluována do 10 μ l sterilní destilované vody. V případě přítomnosti více fragmentů byly ty požadované vyřezány sterilním skalpelem a umístěny do sterilních eppendorfek. Poté byly extrahovány z gelu pomocí kitu ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kat (ZymoResearch) či pomocí Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche) a to podle příloženého protokolu. Vzorek byl poté elulován do 10 μ l sterilní destilované vody. Koncentrace získané DNA byla změřena na spektrofotometru (NanoDrop® ND-1000). Takto získaná purifikovaná DNA mohla být použita pro sekvenování či klonování.

3.8. Klonování

Pokud nebylo získáno dostatečné množství čistých PCR produktů pro sekvenaci, bylo třeba je zaklonovat do bakterií. K tomuto procesu byl používán kit pGEM-T Easy Vector (Promega) a kompetentní buňky Escherichia coli XL1. Tato metoda je založená na modro-bílé selekci rekombinantů, přičemž kolonie obsahující námi požadovaný inzert jsou bílé. Takto bylo získáno větší množství DNA, které bylo následně osekvenováno.

3.8.1. Ligační směs pro klonování

Byla namíchána ligační reakce pomocí kitu p-GEM®-T Easy Vector (Promega), která probíhala přes noc v lednici při teplotě 4°C.

Tab. 13. Složení ligační reakce.

2X Ligační pufr	5 μ l
pGEM plasmidy (50ng/ μ l)	1 μ
PCR produkty	1-2 μ l
T4 ligáza	1 μ l
sterilní destilovaná H ₂ O	doplnit do 10 μ l

Poté následovala transformace kompetentních buněk. Kompetentní buňky byly po dobu 5 minut rozmrazeny na ledu. Ligační směs se krátce stočila a byla napipetována k bakteriím. Mírným poklepáním do mikrozkušavky byla směs promíchána a ponechána na ledu po dobu 30 min. Poté bylo třeba tuto směs provést teplotním šokem po dobu 50s při 42°C. Po uplynutí této doby byla mikrozkušavka ihned vrácena na led, kde byla ponechána 2 min. Poté bylo ke směsi přidáno 300 µl SOC média a nechala se inkubovat na třepačce zhruba 90 min při teplotě 37°C a 180 rpm. Mezitím byly připraveny dvě LB plotny, na které se kličkou rozetřela směs na potření ploten (Tab. 14). Směs s narostlými bakteriemi byla rozetřena kličkou na připravené plotny, přičemž na jednu plotnu bylo nanášeno 50 µl směsi a na druhou zbývající množství. Poté byly plotny umístěny přes noc do termostatu při teplotě 37°C.

Tab. 14. Směs na potření LB ploten.

ampicilin (100mg/ml) (Sigma)	25 µl
0,1 M IPTG (Merck)	100 µl
XGal (50mg/ml) (ThermoScientific)	20 µl

3.8.2. Colony PCR a izolace plazmidů

Pozitivní (bílé) kolonie bakteriální kultury jsme pomocí špiček automatické pipety přenesli do mikrozkušavek s připravenou reakční směsí. Poté byly mikrozkušavky vloženy do termocyklu, kde probíhala PCR pomocí specifických primerů. Pomocí horizontální elektroforézy jsme ověřili, zda se podařilo úspěšně zaklonovat náš fragment. Připravili jsme si falkony se 3 ml tekutého LB média a 3 µl ampicilinu (100ng/ml) a přidali k nim část vzorku pozitivních kolonií obsahující námi požadovaný inzert. Takto připravené falkony byly uloženy na noc do třepačky při teplotě 37°C při 180 rpm. Následující den jsme z narostlé falkony odebrali část kultury pro zamražení, zbytek kultury byl následně použit pro izolaci plazmidové DNA. Při zamrazování jsme odebrali z falkony 800 µl kultury, přemístili ji do mikrozkušavky a přidali 200 µl glycerolu. Celý obsah bych zvortexován a uskladněn v mrazničce při -80°C. K samotné izolaci plazmidů byl použit High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) a postupovalo se podle přiloženého protokolu. Množství získané plasmidové DNA jsme změřili na spektrofotometru (NanoDrop® ND-1000). DNA byla použita do sekvenční reakce nebo byla uchována v mrazničce při -20°C pro pozdější použití.

3.9. Sekvence DNA

Materiálem pro sekvenování byly přečištěné vzorky PCR produktů nebo vzorky plazmidů. Sekvenční reakce byla připravena do mikrozkušavky přidáním sterilní destilované H₂O, primeru a DNA; celkový objem této reakce byl 8 µl (Tab. 15). Pro sekvenování fragmentů z plazmidů se používaly primery SP6 a T7, které jsou komplementární s plazmidem, a vnitřní specifické primery (Tab. 7). Do reakcí s PCR se přidával primer, kterým byl fragment původně amplifikován, a vnitřní specifické primery (Tab. 7). Veškerou sekvenaci prováděla Sekvenční laboratoř PřF UK Praha.

Tab. 15. Sekvenační reakce.

Primer	0,32 µl (10 pmol/µl)
DNA	5-10ng/ 100bp
H ₂ O	doplnit do 8 µl

3.10. Skládání sekvencí

Získaná čtení DNA byla v programu SeqMan v. 7.0.0 (Lasergene) poskládána do jednoho contigu. Poté jsme ze sekvencí odstranili koncové primery a konečný contig byl uložen ve formátu FASTA. Pro přípravu alingmentu byly staženy publikované sekvence rodu *Trimastix* a oxymonád, dále sekvence získané Eliškou Šrámovou, Sebastianem Treitlim a Pavlou Smejkalovou a k nim jsme přidali naše získané sekvence. Aligment byl připraven na serveru MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) algoritmem L-INS-I, ručně opraven v programu BioEdit 7.0.5.3. (Hall, 1999), kde z něj byly vyjmuty variabilní nevěrohodně alignované oblasti, které by mohly mít negativní vliv na analýzu. Také jsme ořezali začátek a konec alignmentu. Délka výsledného upraveného aligmentu pro SSU RNA byla 1758 bp. Jelikož jsme pro některé kmeny měli k dispozici jen pracovní částečné sekvence, připravily jsme dva alignmenty; první s pouze kompletními sekvencemi a druhý i s neúplnými sekvencemi. Fylogenetické stromy jsme tvořili z obou alignmentů metodou maximální věrohodnosti ("maximum likelihood") v programu RAxML (Stamakis, 2006) pomocí internetového serveru (<http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/index.php>) a substitučního modelu GTR+Γ a dále Bayéskou metodou v programu Mr.Bayers 3.1.2. (Huelsenbeck a Ronquist, 2001). Bayéskou analýzu jsme prováděli v programu MrBayes (nst=6, rates=invgamma, covarion=yes). U analýzy s celými sekvencemi běžel Markov Chain Monte Carlo 1000 000 generací a prvních 2 500 stromů bylo vyjmuta jako "burn in". V případě analýzy s částečnými sekvencemi MCMC běžel 2 100 000 generací a prvních 5250 stromů bylo odebráno jako "burn in". Fylogenetické stromy jsme upravili v programu FigTree 1.3.1. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) a následná grafická úprava proběhla v programu CorelDrawX3, verze 13.

3.11. Morfologie a ultrastruktura

Preparáty kultur jsme vyšetřovali světelnou a transmisní elektronovou mikroskopií. Světelná mikroskopie zahrnovala pozorování jednak nativních preparátů i preparátů barvených protargolem.

3.11.1. Pozorování světelným mikroskopem

Při pozorování nativních preparátů byla ke kapce kultury přidána kapka 1% celulózy či 4% methylcelulózy. Tím došlo ke zpomalení buněk a mohli jsme pořídit mikrofotografie. Takto připravené preparáty byly pozorovány mikroskopem Olympus BX 51 s použitím Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu. Pozorované buňky byly snímány kamerou Olympus DP70 a snímky byly dále zpracovány v programu QuickPHOTO CAMERA 2.3.

V případě barvení protargolem jsme z dobře narostlých kultur vytvořili vlhký roztěr na krycích sklíčkách, fixovali jej Bouin-Hollandovou fixází a převedli alkoholovou řadou. Poté

byly preparáty barveny protargolovou metodou podle Nie (1950, modifikováno). Metoda je časově náročná a kvalita preparátů nemusí být pokaždé stejná, proto jsme od každého kmene připravili 3 roztěry. Kvalitu výsledných preparátů vždy zkontroloval Doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D. pomocí světelného mikroskopu. Buňky oxymonád jsme poté pozorovali světelným mikroskopem Olympus při zvětšení 1000x ve světlém poli a zaznamenávali je digitálním fotoaparátem Olympus pomocí programu QuickPHOTO CAMERA 2.3. Od některých buněk jsme pořídili více snímků v různých rovinách ostrosti, které jsme později spojili do finální fotografie v programu Helicon Focus 4.48. Dodatečnou úpravu fotografií jak živých buněk, tak fixovaných jsme prováděli v programu Microsoft Office PowerPoint 2007.

3.11.2. Měření buněk

Měření bylo prováděno na protargolových preparátech. Nejdříve byla zaznamenána buňka digitálním fotoaparátem Olympus pomocí programu QuickPHOTO CAMERA 2.3. Na takto zaznamenané buňce jsme měřili rozměry pomocí výše uvedeného programu. Zaznamenávali jsme délku a šířku buňky a délku šířku jádra. Od každého kmene bylo změřeno 30 buněk.

3.11.3. Pozorování pomocí transmisního elektronového mikroskopu

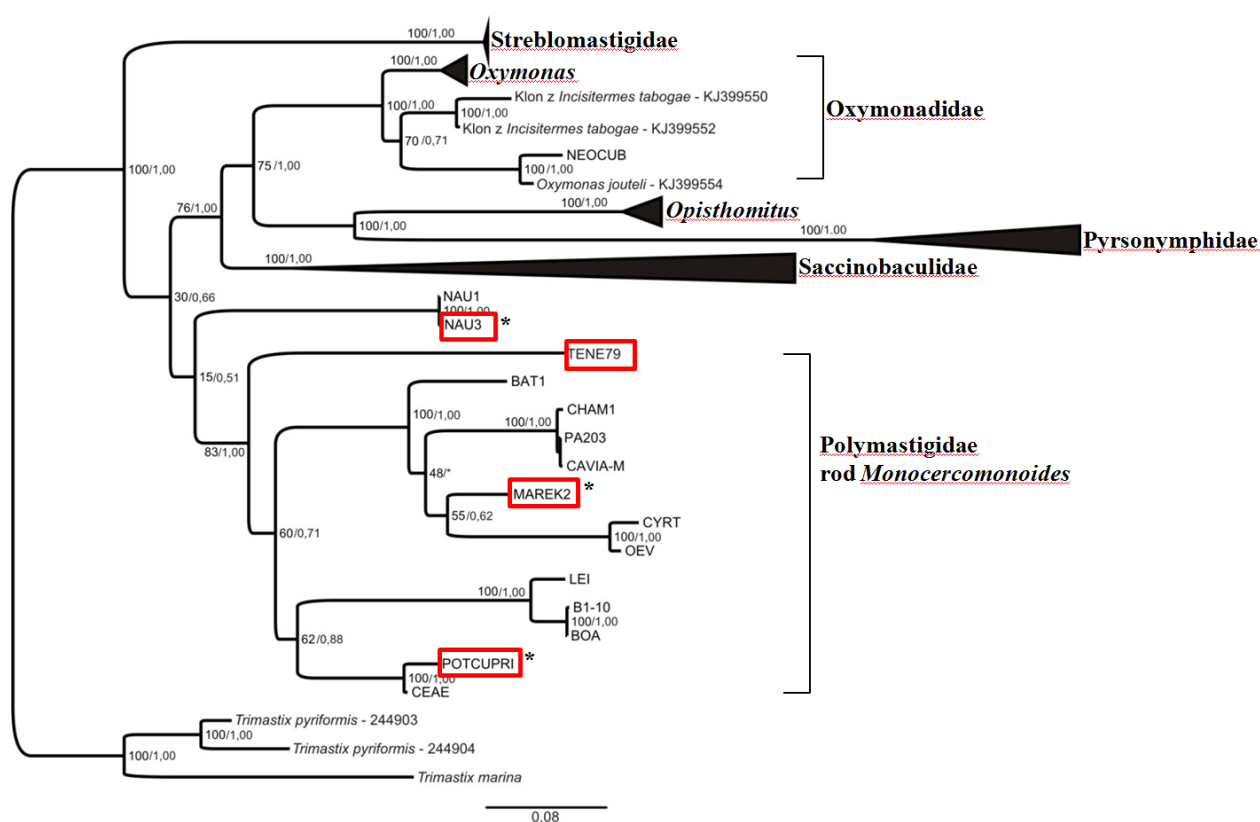
K fixaci buněk jsme používali chemickou fixáž a kryosubstituci. Běžná fixáž byla připravena smícháním CaCl_2 a 2,5% glutaraldehydu v 0,1M v kakodylátovém pufru tak, aby konečná koncentrace CaCl_2 byla 5mM. V případě fixáže podle Karnovského byl servisní laboratoři elektronové mikroskopie připraven 20% roztok paraformaldehydu zahřátého na 65°C, přičemž byl do roztoku po kapkách přidáván 1M NaOH až do úplného vyčeření roztoku. Ke zchlazenému roztoku byl přidán 25% glutaraldehyd, 0,2M kakodylátový pufr a sterilní destilovaná voda. Konečná koncentrace fixáže je 5% GA a 4% formaldehyd. Do chemických fixází mohla být přidána 2-3 zrnka sacharózy pro zlepšení osmolarity fixáže. Z dobře narostlé kultury bylo odebráno 1,5 ml do mikrozkušavky. Dále byla kultura centrifugována 5 minut při 2 500 g, poté byl odebrán supernatant. K peletu byl přidán 1 ml vychlazené fixáže. Vzorek byl opatrně promíchán a předán pracovníkovi Laboratoře elektronové mikroskopie PřF UK. V případě kryosubstituce jsme připravili jednu zkumavku s dobře narostlou kulturou a druhou s čistým médiem, které je potřeba k promývání. Tyto zkumavky byly po předchozí dohodě předány do servisní laboratoře. Řezy byly prohlíženy transmisním elektronovým mikroskopem JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta. Snímky byly dále zpracovány v programu Olympus Soft Imaging Solution.

4. Výsledky

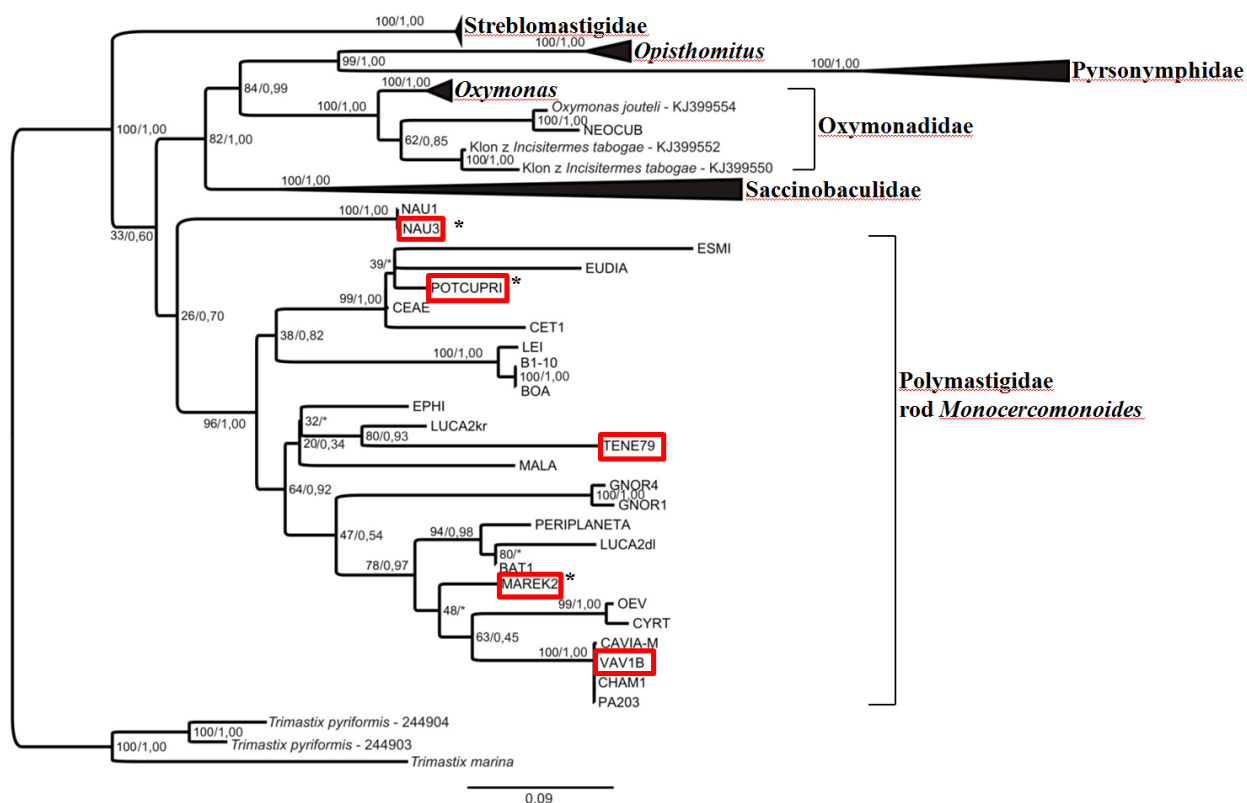
4.1. Molekulární fylogenetika

Podářilo se nám osekvenovat velkou část genu pro SSU rRNA kmenů POTCUPRI a MAREK2. Z těchto dat, ze sekvencí získaných Eliškou Šrámovou během její diplomové práce (Šrámová, 2012), nepublikovaných sekvencí získaných Sebastianem Treitlim a Pavlou Smejkalovou a ze sekvencí oxymonád publikovaných v NCBI jsme vytvořili dva fylogenetické stromy metodou „maximum likelihood“. První strom (Obr. 2) obsahuje jen kmeny, ze kterých jsou dostupné celé sekvencované části tohoto genu, do druhého (Obr. 3) jsme zahrnuli i kmeny, pro něž máme k dispozici jen rozpracované a tedy neúplné sekvence. Strom jsme zakořenili rodem *Trimastix*, sesterským taxonem oxymonád. Rod *Monocercomonoides* tvoří na fylogenetickém stromu dobře podpořenou skupinu (bootstrap 83, posteriorní pravděpodobnost 1,00) kromě kmene NAU3, jehož postavení je nejisté, a tím zajímavé. Na stromu jsme vybrali zástupce několika nepříbuzných skupin pro morfologickou charakterizaci, ti jsou označeni červeně (Obr. 2, 3).

Obr.2. Fylogenetický strom s kompletními sekvencemi vytvořený metodou maximum likelihood a zakořeněný rodem *Trimastix*. Hodnoty na uzlech značí bootstrapovou podporu získanou metodou maximum likelihood v programu RAXML/ posteriorní pravděpodobnost získanou Bayeskou metodou v programu MrBayes. Sekvence získané v této práci jsou označeny symbolem *. Kmeny studované morfologicky v této práci jsou označeny červenými obdélníky.



Obr. 3. *Fylogenetický strom zahrnující také kmeny s rozpracovanými sekvencemi konstruovaný metodou maximum likelihood, zakořeněný rod Trimastix. Hodnoty na uzlech značí bootstrapovou hodnotu získanou metodou maximum likelihood v RAxML/ posteriorní pravděpodobnost získanou Bayeskou metodou v programu MrBayes. Sekvence získané v této práci jsou označeny symbolem *. Kmeny studované morfologicky v této práci jsou označeny červenými obdélníky.*



4.2. Morfologické znaky

Pomocí světelné a transmisní elektronové mikroskopie jsme studovali tyto vybrané kmeny: TENE79, POTCUPRI, VAV1B, MAREK2 a NAU3. Všechny studované kmeny a jejich hostitelé jsou uvedeny v Tab. 1. Kmeny VAV1B a MAREK2 jsou výjimečné v tom, že byly získány z dvou dlouhodobě nepoužívaných septiků. Kulturu MAREK2 jsme získali v průběhu práce a chtěli jsme zjistit, zda se morfologicky liší od druhého kmene izolovaného ze septiku – VAV1B, který byl studován Eliškou Šrámovou (Šrámová, 2012).

4.2.1. Morfometrie

Tři kmeny (TENE79, POTCUPRI a VAV1B) jsme studovali také pomocí morfometrie. Měření se provádělo na preparátech barvených protargolem. Na základě dostupných publikací jsme sestavili tabulku rozměrů popsaných druhů (Tab. 16). Stejně jako v publikovaných popisech jsme zaznamenávali délku a šířku buňky a délku a šířku jádra, přičemž od každého kmene bylo měřeno 30 buněk. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 16. Jelikož byly rozdíly v rozměrech buněk našich kmenů nepatrné, nebyli jsme schopni touto metodou rozlišit kmeny mezi sebou, natož je přiřadit k již popsaným druhům, nehledě na to, že v publikovaných popisech buněk používali většinou barvení Giemsou. Rozměry takto barvených buněk nejsou s našimi rozměry srovnatelné. Proto jsme v další práci od morfometrie upustili.

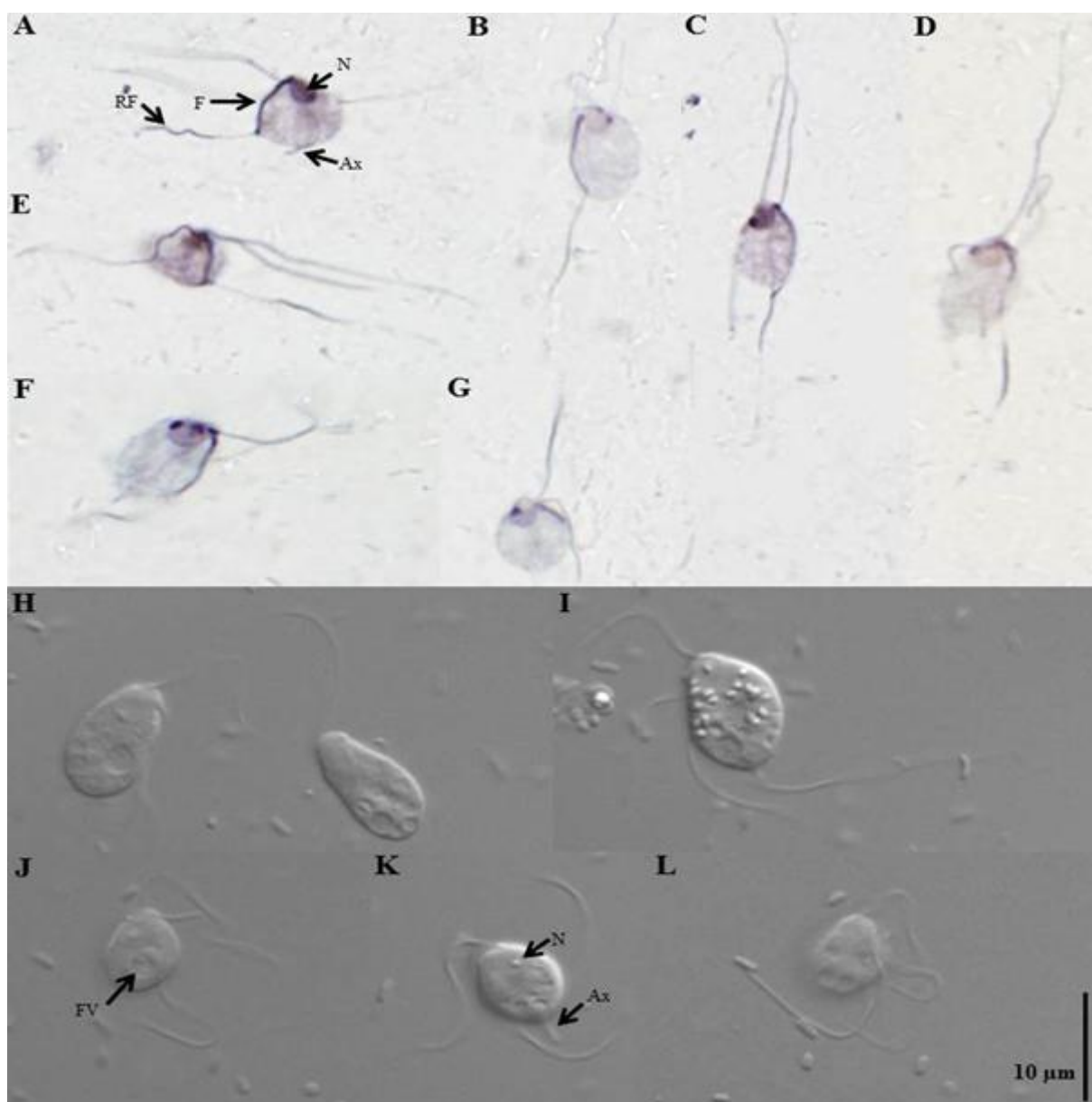
Tab. 16. Rozměry popsaných druhů rodu *Monocercomonoides* a kmenů měřených Eliškou Šrámovou a námi. Námi naměřené hodnoty jsou označeny červeně, symbolem. DT- délka těla, ŠT- šířka těla, DJ- délka jádra, ŠJ- šířka jádra.

Druh	DT (μm)	Průměr (μm)	ŠT (μm)	Průměr (μm)	DJ (μm)	ŠJ (μm)	Barvení	Citace
<i>M. adarshii</i>	12,85 - 21,07	15,52	6,68 - 21,59	13,16	2,57 - 6,17	2,05 - 7,19	Giemsa	Mali a Kulkarni, 2001
<i>M. aurangabadae</i>	6,68 - 12,33	8,58	5,65 - 12,33	7,81	1,54 - 3,59	2,05 - 3,59	Giemsa	Mali a Patil, 2003
<i>M. caviae</i>	4,0 - 8,0		2,7 - 6,6				Protargol	Nie, 1950
<i>M. dobelli</i>	6,7 - 14,4	9,2	5,1 - 12,9	7,7	1,5 - 3,6	1,5 - 4,1	Giemsa	Krishnamurthy a Madre, 1979
<i>M. exilis</i>	3,5 - 8,8 p	5,5	2,5 - 5,5	3,5			Protargol	Nie, 1950
<i>M. gryllusae</i>	6,2 - 12,3		4,6 - 11,3		1,5 - 3,6	2,1 - 4,1	Giemsa	Sultana a Krishnamurthy, 1977
<i>M. hausmanni</i>	7,7	6,5			2,4		neuveveno	Radek, 1997
<i>M. chakravartii</i>	5,7 - 9,8	7,4	5,7 - 13,4	7,2	2,1	2,6	Giemsa	Krishnamurthy a Sultana, 1975
<i>M. indica</i>	5,5 - 11,0	8,4	4,0 - 11,0	7,4	1,5 - 3,0	1,5 - 3,5	Giemsa	Navarathnam, 1970
<i>M. khultabadae</i>	7,71 - 13,88	9,66	6,68 - 14,39	8,63	1,54 - 4,11	2,05 - 4,11	Giemsa	Mali M. a S., 2004
<i>M. krishnamurthii</i>	5,7 - 9,8	7,4	3,6 - 7,2	5,2	1,0 - 3,1	1,5 - 4,1	Giemsa	Sultana, 1976
<i>M. lacertae</i>	7 - 8		3 - 5					Moskowitz, 1951
<i>M. lepusi</i>	4,23 - 9,46	7,1	3,76 - 7,52	4,65	0,47 - 1,88		Giemsa	Todd, 1963
<i>M. mehdii</i>	7,20 - 17,48	11,44	5,66 - 17,99	10,57	2,1 - 5,1	2,1 - 5,1	Giemsa	Krishnamurthy, 1967
<i>M. omergae</i>	8,73 - 26,21	16,55	10,79 - 29,30	15,37	2,05 - 6,68	2,05 - 6,68	Giemsa	Mali a Kulkarni, 2001
<i>M. sayeedi</i>	4,8 - 10,0	7	3,5 - 8,7	6,3			Giemsa	Abraham, 1961
<i>M. shortti</i>	5,0 - 10,5	6,96	4,5 - 9,0	6,73	1,5 - 3,0	5,0 - 8,5	Giemsa	Navarathnam, 1970
<i>M. singhi</i>	6,68 - 11,31	8,72	4,11 - 10,28	7,25	2,43	2,56	Giemsa	Krishnamurthy, 1967
<i>M. spirostreptae</i>	8,2 - 16,0	10,9	5,1 - 13,9	9,8	3,4	3,6	neuveveno	Krishnamurthy a Sultana, 1980
<i>M. termitis</i>	8,3	4,9			2,9		neuveveno	Radek, 1994
<i>M. wenrichi</i>	3,3 - 11,5	6,6	3,0 - 8,4	5,2			Protargol	Nie, 1950
<i>OEV</i>	5 - 8,4	6,49	2,9 - 5,5	4,13	1,0 - 2,4		Protargol	Šrámová, 2012
<i>B1-10</i>	4 - 6,6	5,54	2,5 - 4	3,29	1,1 - 2,0		Protargol	Šrámová, 2012
<i>LEI</i>	4 - 7,1	5,67	2,07 - 4,6	3,50	1,3 - 2,0		Protargol	Šrámová, 2012
<i>CAVIA-M</i>	3,6 - 7	5,42	2,5 - 4	3,12	1,0 - 1,9		Protargol	Šrámová, 2012
<i>TENE79</i>	6,4 - 13,3	7,99	4,4 - 6,2	5,35	1,7 - 2,8	1,8 - 2,9	Protargol	
<i>POTCUPRI</i>	6,5 - 10,8	8,74	4 - 6,1	5,22	1,6 - 3,1	1,8 - 2,7	Protargol	
<i>VAVIB</i>	6 - 10,7	7,69	3,7 - 5,8	4,94	1,9 - 3	2,1 - 3	Protargol	

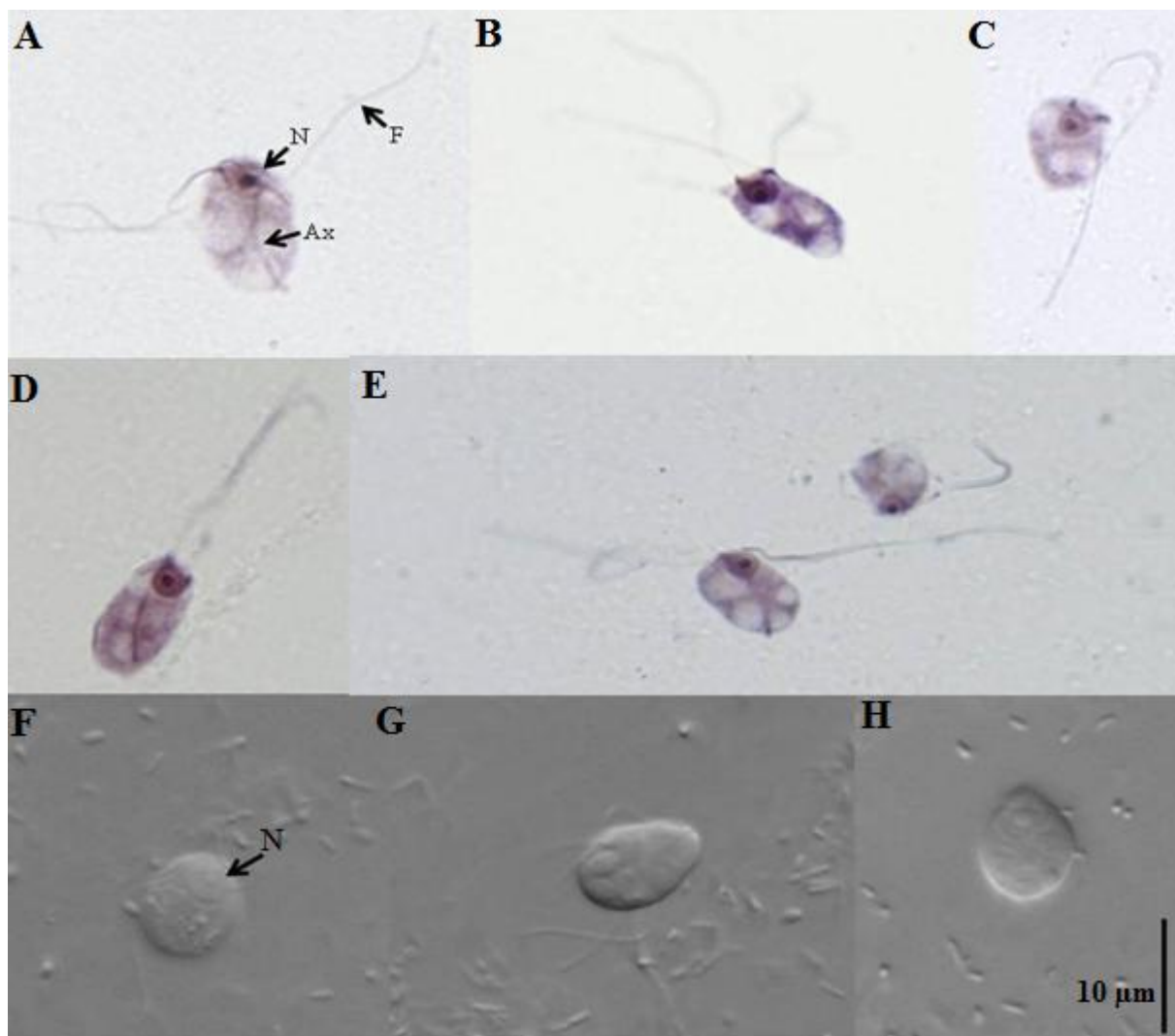
4.2.2. Světelná mikroskopie

Světelnou mikroskopií jsme pozorovali živé buňky v Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastu a preparáty barvené protargolem ve světlém poli. Na preparátech barvených protargolem jsme se soustředili na polohu karyosomu, a na sílu a délku fibrily R1, resp. na poměr délky fibrily R1 k velikosti buňky. Na obrázcích 4 - 8 jsou snímky protargolem barvených buněk ve světlém poli a živých buněk v Nomarského DIC kontrastu. Živé buňky kmene NAU3 se nám nepodařilo zdokumentovat, pohybovaly se příliš rychle i po přidání methylcelulózy.

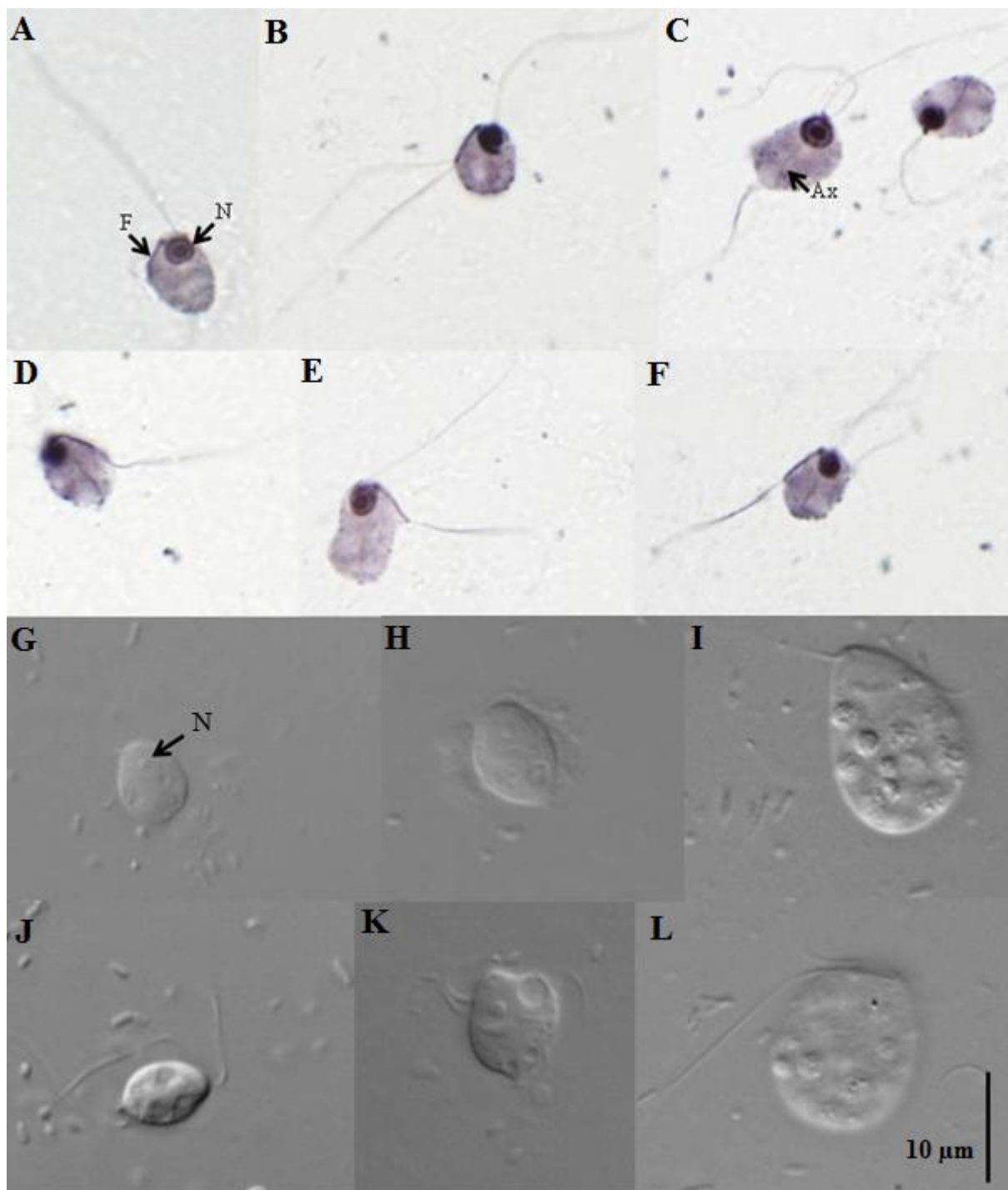
Obr. 4. Snímky protargolem barvených buněk ve světlém poli (A-F) a živých buněk v Nomarského DIC kontrastu (H-L) kmene TENE79. Obrázky D a F vznikly složením více rovin ostrosti (měřítko 10 μm ; vysvětlivky: N – jádro, Ax – axostyl, F – fibrila R1, RF – zpětný bičík).



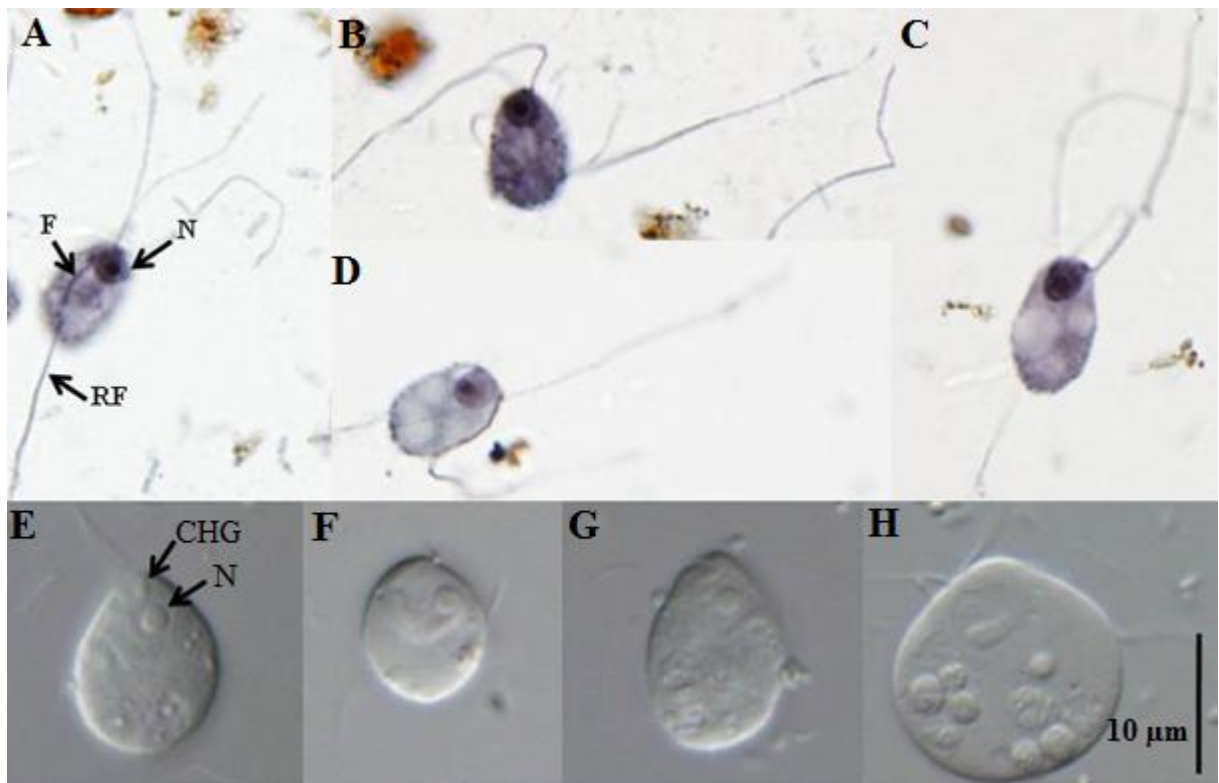
Obr. 5. Snímky protargolem barvených buněk ve světlém poli (A-E) a živých buněk v Nomarského DIC kontrastu (F-H) kmene POTCUPRI (měřítko 10 μm ; vysvětlivky: N – jádro, Ax – axostyl, F – fibrila R1, RF – zpětný bičík).



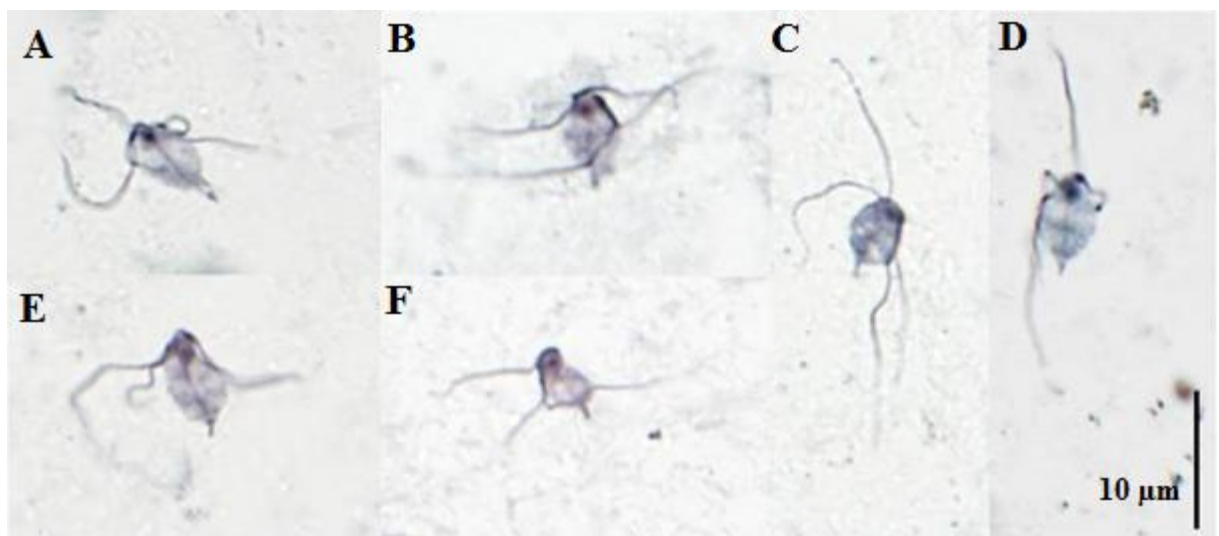
Obr. 6. Snímky protargolem barvených buněk ve světlém poli (A-F) a živých buněk v Nomarského DIC kontrastu kmene VAVIB (G-L) (měřítko 10 μm ; vysvětlivky: N – jádro, Ax – axostyl F – fibrila R1).



Obr. 7. Snímky protargolem barvených buněk ve světlém poli (A-D) a živých buněk v Nomarského DIC kontrastu kmene MAREK2 (E-H) (měřítko 10 μm ; vysvětlivky: N – jádro, Ax – axostyl, F – fibrila R1, CHG – chromatinová granula, RF – zpětný bičík).



Obr. 8. Snímky protargolem barvených buněk ve světlém poli kmene NAU3 (A-F) (měřítko 10 μm ; vysvětlivky: N – jádro, Ax – axostyl, F – fibrila R1, RF – zpětný bičík), snímky E, F poskytla Pavla Smejkalová.



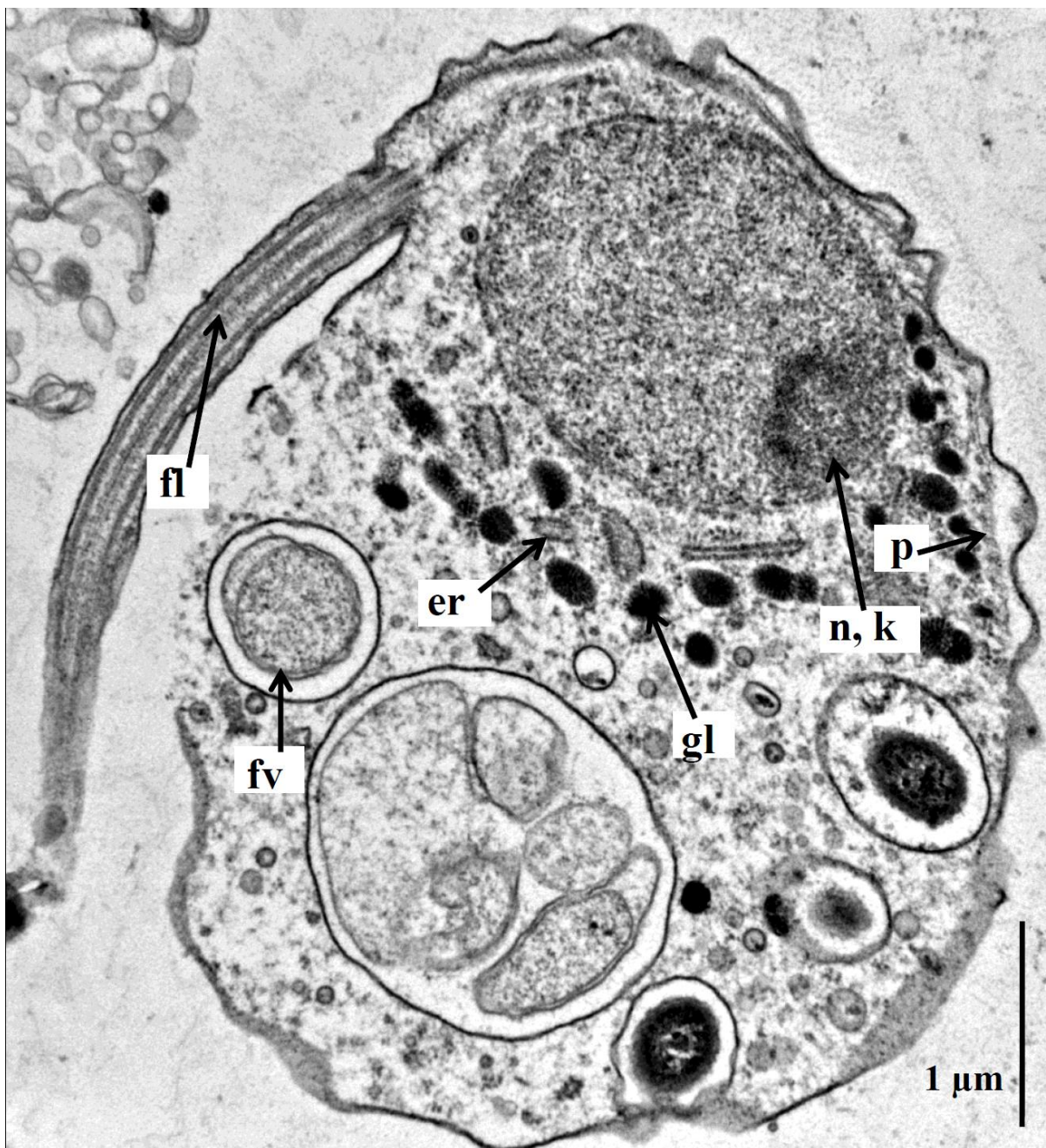
4.2.3. Elektronová mikroskopie

Za stěžejní metodu studia morfologie jsme považovali transmisní elektronovou mikroskopii. Zaměřili jsme se na znaky, které se při prvním pozorování jeví jako odlišné mezi jednotlivými kmeny, což byla poloha karyosomu, uspořádání endoplazmatického retikula a počet mikrotubulů ve fibrile R1. Dále jsme srovnávali celkový vzhled buněk a hledali jsme mitochondrie či dvoumembránové organely. Kvalita fixace se velmi lišila mezi kmeny. U některých z nich jsme proto zkoušeli více typů fixací, abychom dosáhli co nejlepších výsledků.

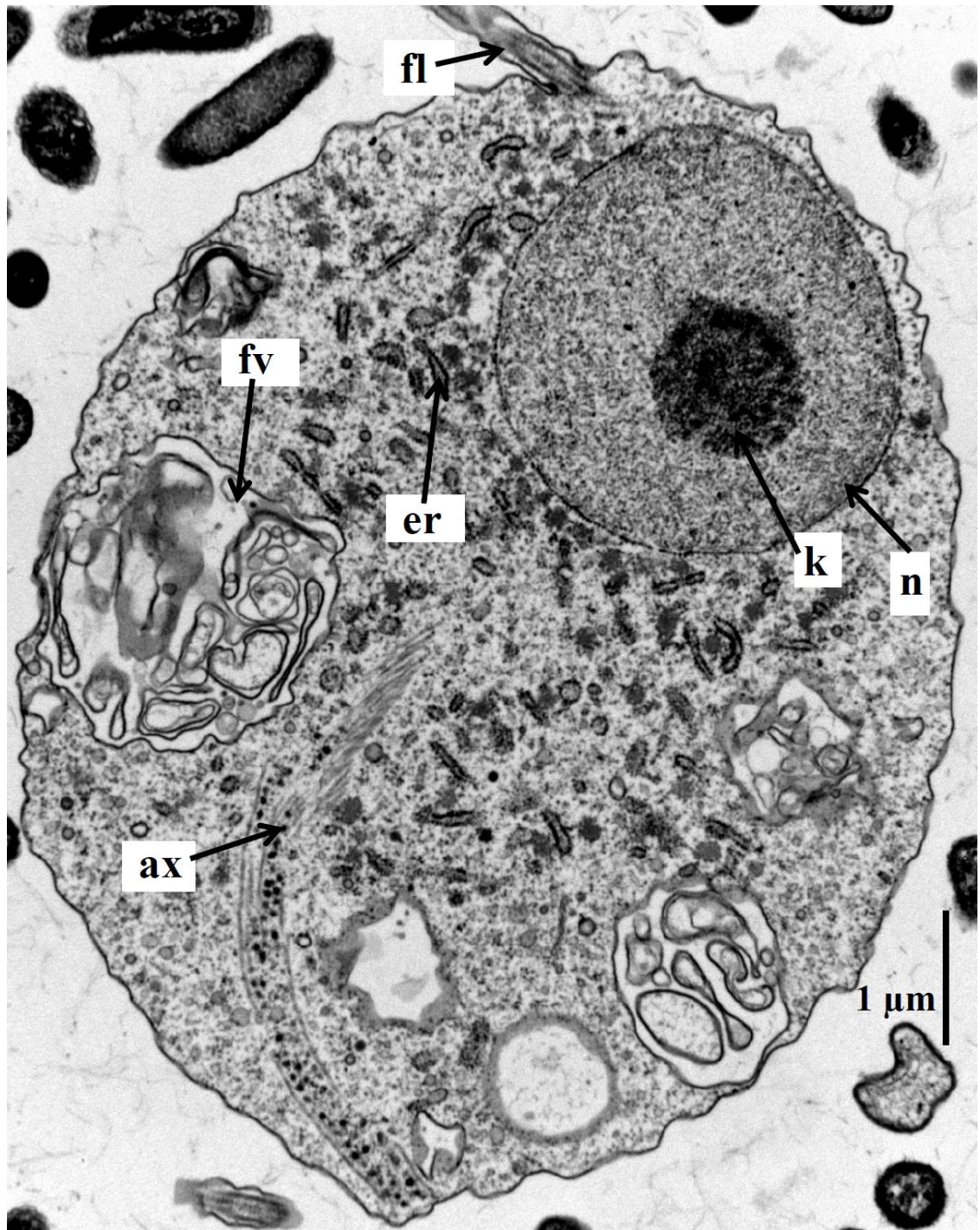
Tab. 17. Použitá fixace studovaných kmenů.

Název kmene	Použitá fixace
TENE79	2,5 % glutaraldehyd v kakodylátovém pufru
POT CUPRI	2,5 % glutaraldehyd v kakodylátovém pufru
VAV1B	2,5 % glutaraldehyd v kakodylátovém pufru
MAREK2	2,5 % glutaraldehyd v kakodylátovém pufru, Karnovského fixáž se zrnky sacharózy, kryosubstituce
NAU3	Karnovského fixáž se zrnky sacharózy, kryosubstituce

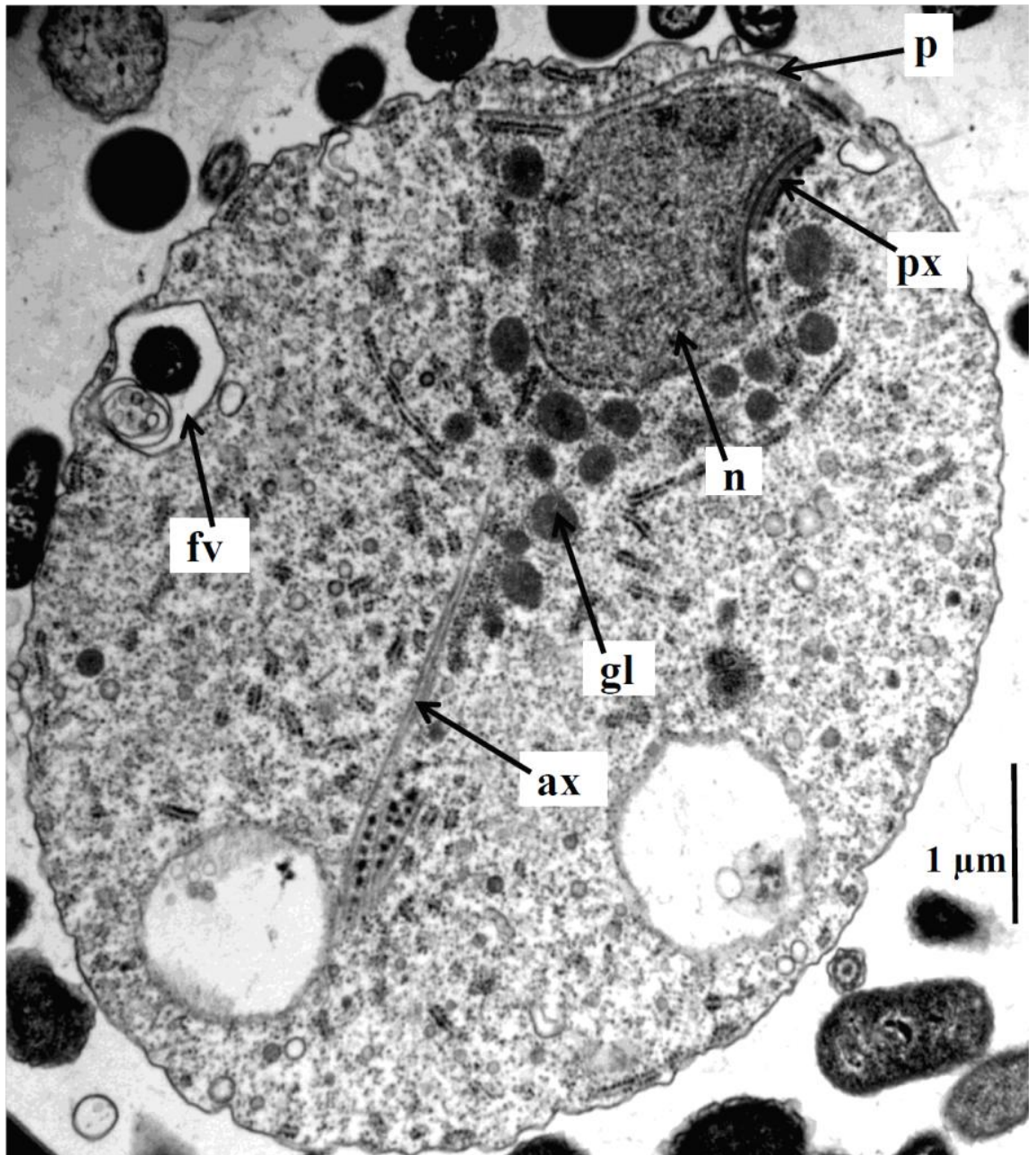
Obr. 9. Přehledná TEM kmene *TENE79* (měřítko 1 μm ; vysvětlivky: *n* – jádro, *k* – karyosom, *chg* – chromatinová granula, *p* – pelta, *px* – praxostyl, *ax* – axostyl, *er* – endoplazmatické retikulum, *gl* – glykogenová granula, *fv* – potravní vakuola, *b* – bičík, *bc* – bakterie; fixováno 2,5% GA v kakodylátovém pufru).



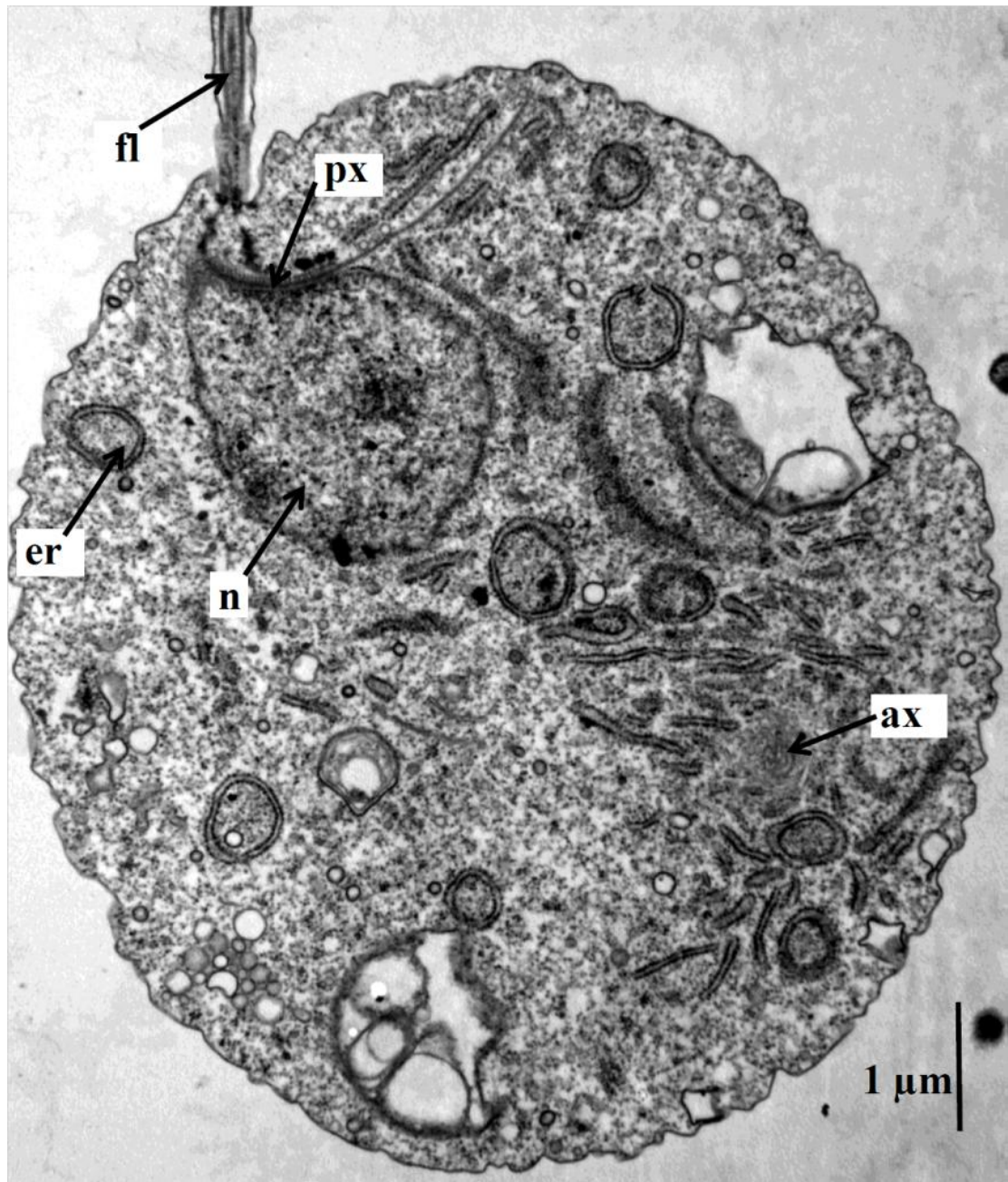
Obr. 10. Přehledná TEM buněk kmene POTCUPRI (měřítko 1 μm ; vysvětlivky viz Obr. 9.; fixováno 2,5 % GA v kakodylátovém pufru).



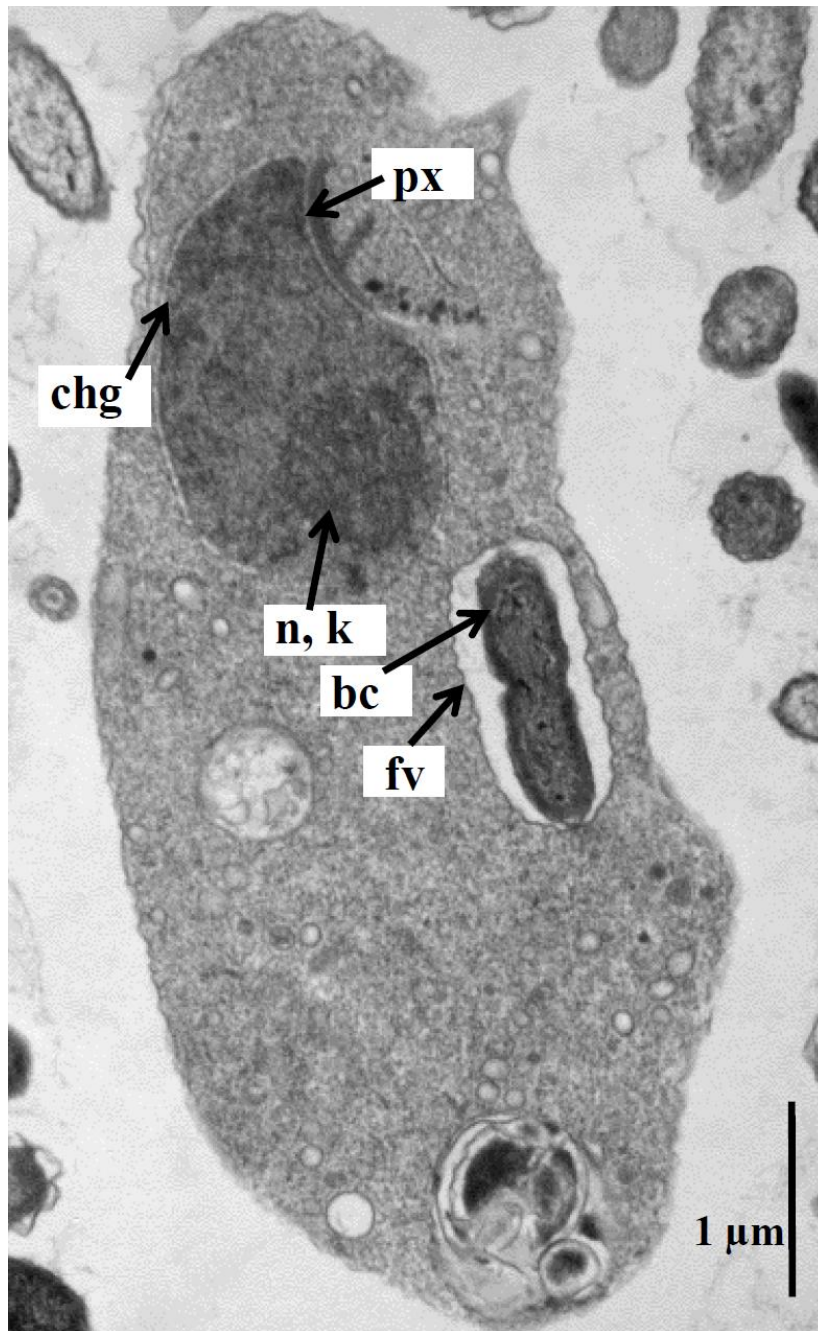
Obr. 11. Přehledná TEM kmene VAVIB (měřítko 1 μm ; vysvětlivky viz Obr. 9.; fixováno 2,5% GA v kakodylátovém pufru).



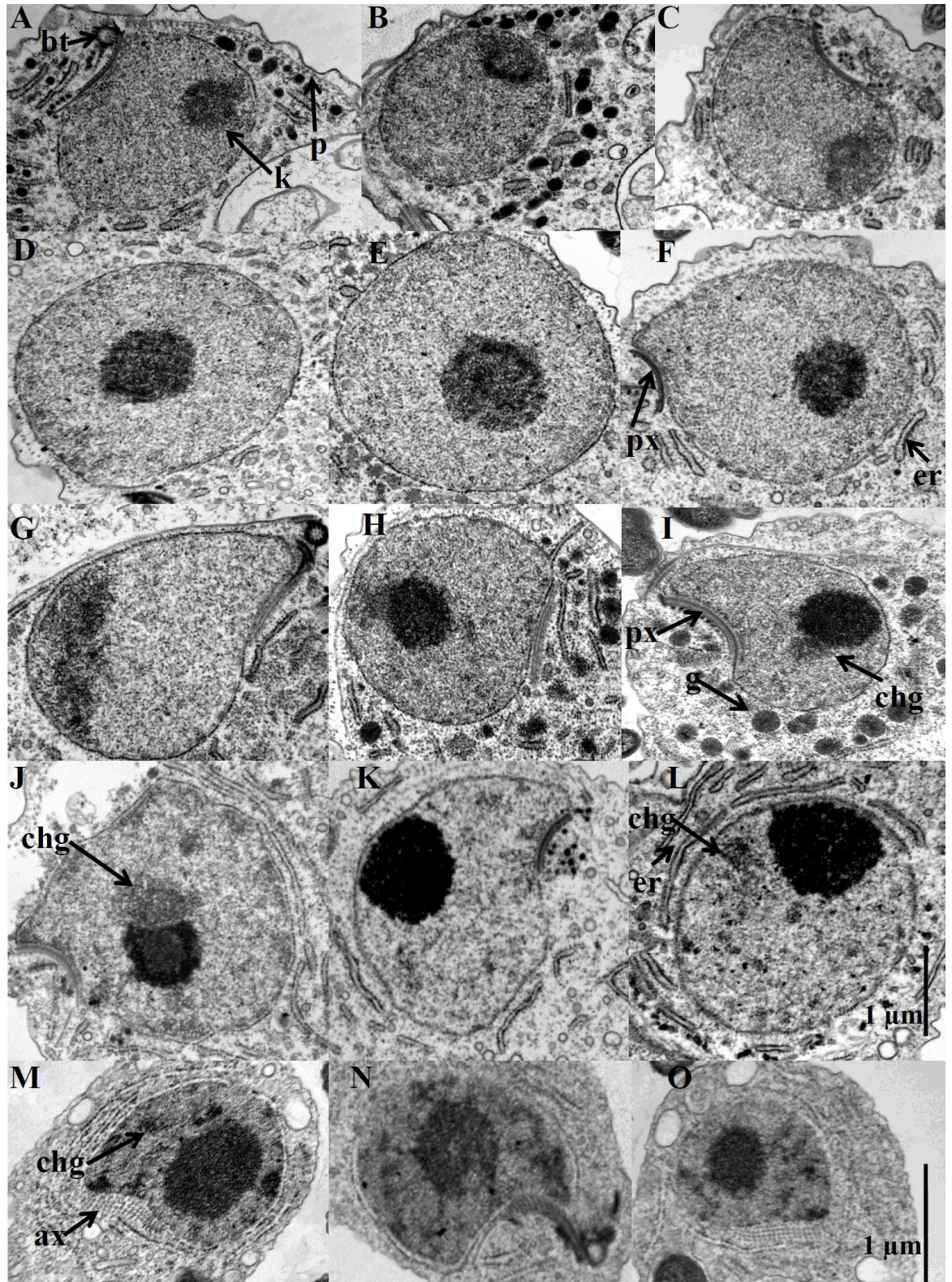
Obr. 12. Přehledná TEM kmene MAREK2 (měřítko 1 μm ; vysvětlivky viz Obr. 9., fixováno Karnovského fixází se zrnky sacharózy).



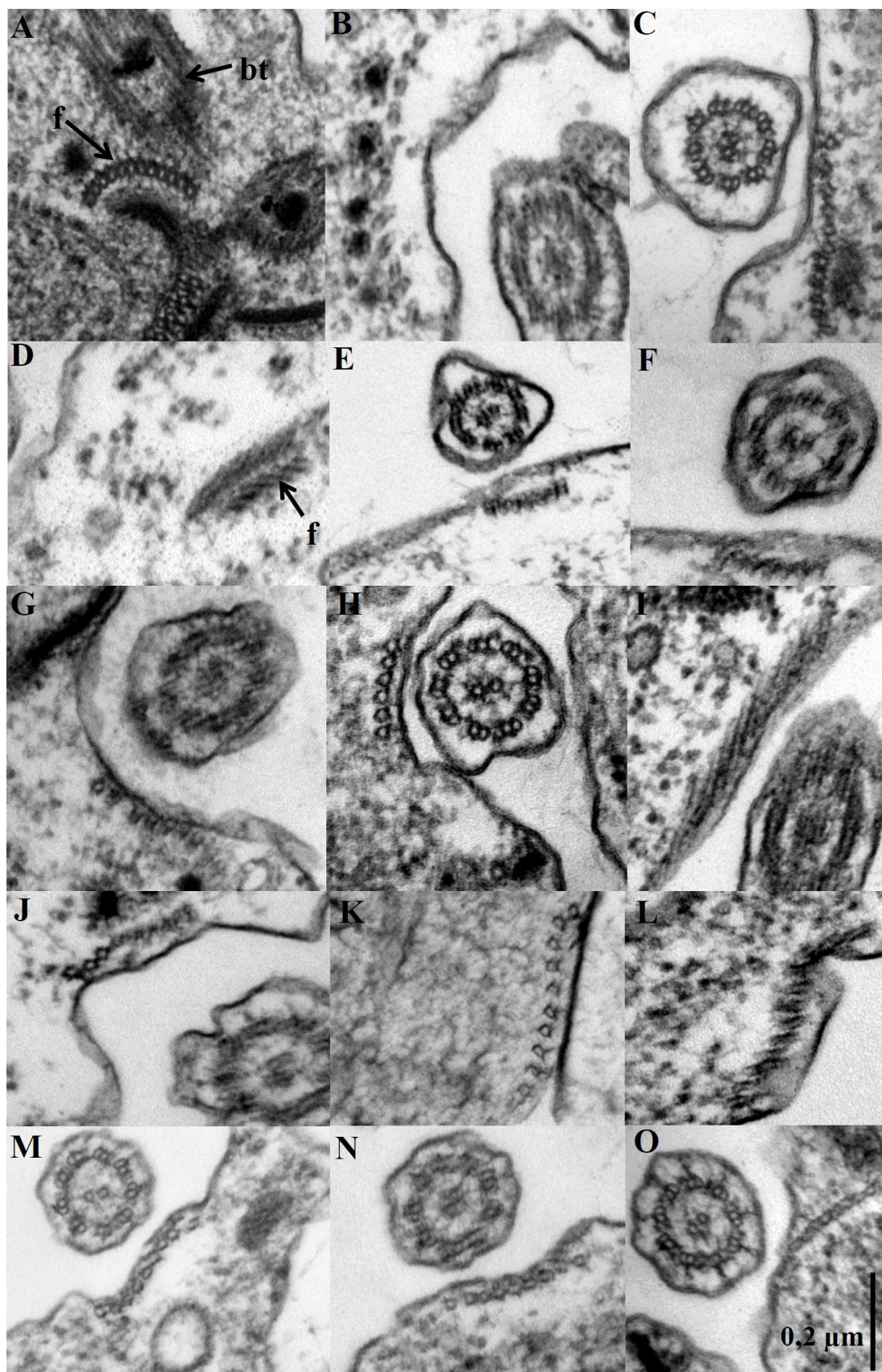
Obr. 13. Přehledná TEM kmene NAU3 (měřítko 1 μm ; vysvětlivky viz Obr. 9.; fixováno kryosubstitucí).



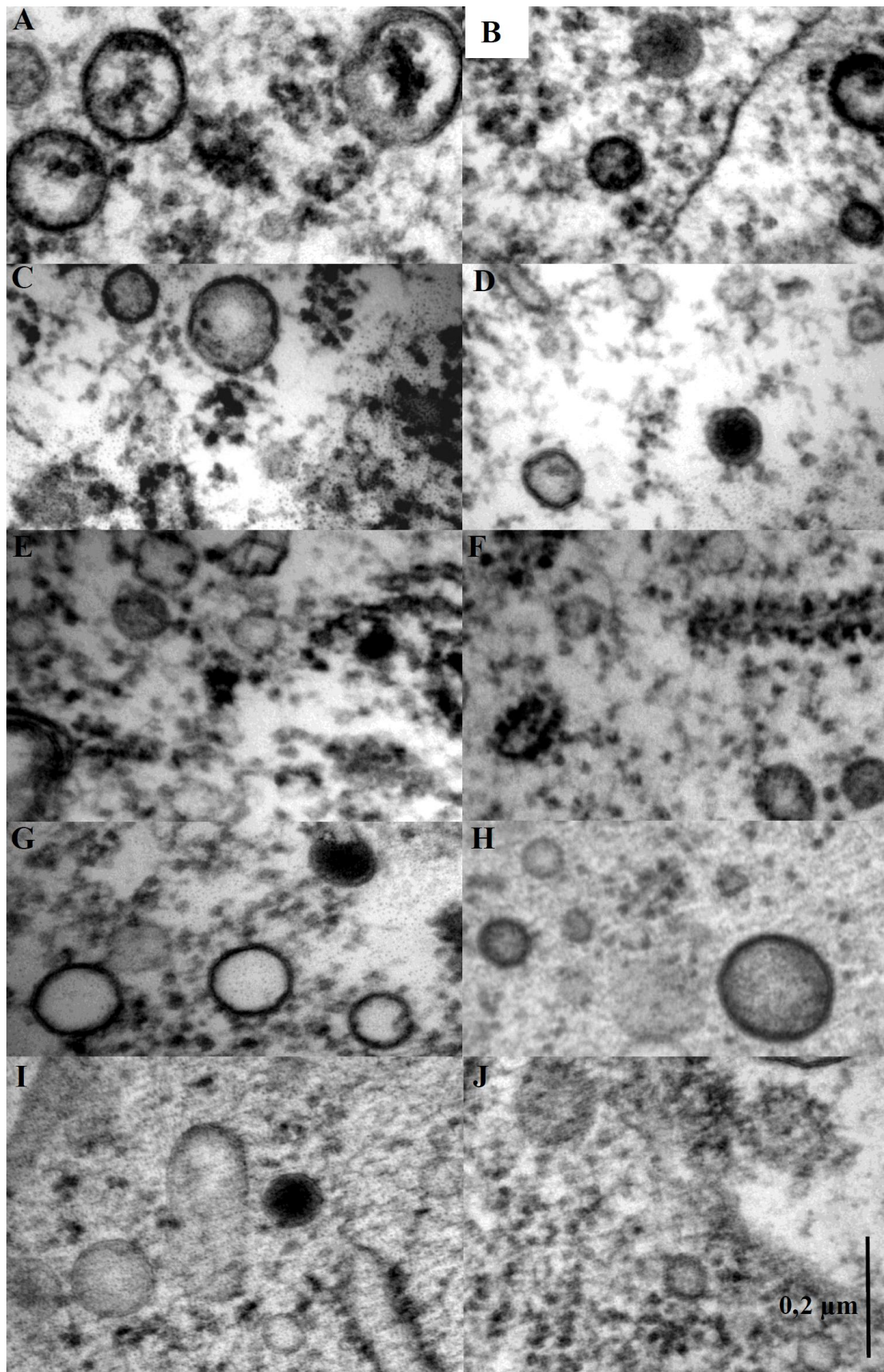
Obr. 14. TEM jader a jejich okolí u různých kmenů rodu *Monocercomonoides*; měřítko 1 μ m; A-C kmen TENE79, D-F kmen POTCUPRI, G-I kmen VAV1B, J-L kmen MAREK2, M-O kmen NAU3 (vysvětlivky: bt – bazální tělísko, k – karyosom, p – pelta, px – preaxostyl, ax – axostyl, chg – chromatinová granula, er – endoplazmatické retikulum).



Obr. 15. TEM fibrily R1 různých kmenů rodu *Monocercomonoides*; měřítko 0,2 μm , A-C kmen TENE79, D-F kmen POTCUPRI, G-I kmen VAV1B, J-L kmen MAREK2, M-O kmen NAU3 (vysvětlivky bt – bazální tělísko; f – fibrila R1).



Obr. 16. TEM drobných měchýřků u různých kmenů rodu *Monocercomonoides*, A-B TENE79, C-D POTCUPRI, E-F VAV1B, G-H MAREK2, I-J NAU3 (měřítko 0,2 μm).



4.2.4. Celkový vzhled buněk

Celkový vzhled buněk jsme pozorovali na živých buňkách a na preparátech barvených protargolem. Tvar buněk barvených protargolem je převážně oválný, živé buňky mají až kulatý tvar. Velkých rozměrů a kulatého tvaru dosahují buňky, které jsou ve stresu. V přední části buňky jsou čtyři bičíky oddělené do dvou párů. Toto bylo viditelné zejména na protargolem barvených buňkách, u živých se nám nepodařilo zachytit všechny bičíky. U živých buněk jsme zřídka pozorovali vybíhající axostyl, který byl i na protargolových preparátech barven slabě. Buňky kmene NAU3 jsou výrazně menší, mají špičatý posteriorní konec a fibrila R1 není tak patrná. Pomocí TEM jsme v buňkách kmene VAV1B jsme často pozorovali přítomnost velkých glykogenových granulí. Některé buňky kmene MAREK2 měly v cytoplasmě velké spirály endoplazmatického retikula.

4.2.5. Karyosom

Na základě pozorování pomocí světelné a elektronové mikroskopie jsme došli k závěru, že karyosom kmene TENE79 je umístěn parietálně, což je viditelné i na živých buňkách. Karyosom kmene POTCUPRI je umístěn centrálně, což je také podpořeno pozorováním živých buněk. V případě kmene VAV1B a MAREK2 je karyosom parietální. Karyosom kmene NAU3 se zdá být centrální, to však usuzujeme pouze z pozorování buněk fixovaných kryosubstitucí. Chemická fixáž je pro zachování karyosomu vhodnější a v tomto případě se nezdařila.

4.2.6. Fibrila R1

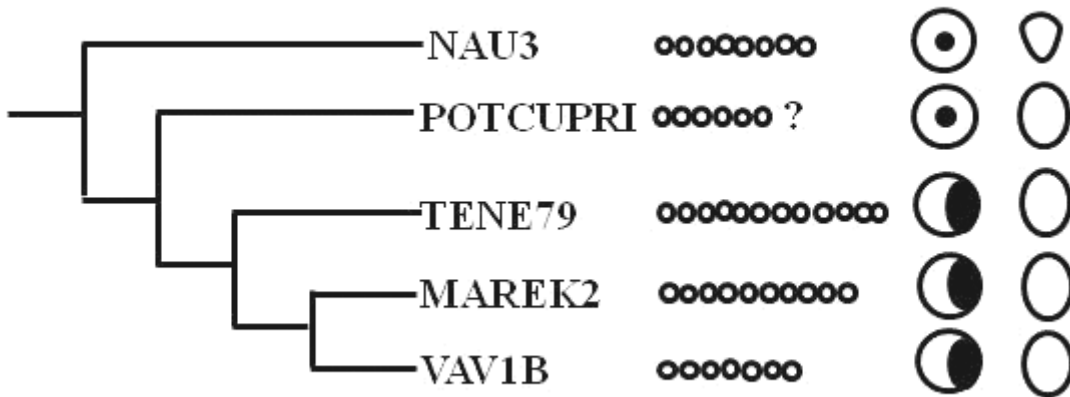
Všimli jsme si, že se jednotlivé kmeny liší počtem mikrotubulů tvořících tuto fibrilu podkládající zpětný bičík. Pro účely srovnání jsme se snažili hledat průřez fibrilou především na úrovni jádra, protože jsme předpokládali, že zde bude počet mikrotubulů největší, směrem k zadní části buňky se může snižovat. U kmene TENE79 jsme napočítali 12 mikrotubulů v této fibrile. Kmen POTCUPRI má R1 složenou z 6-7 mikrotubulů. Nepodařilo se nám nalézt žádný přehledný příčný řez, který by jednoznačně ukázal jejich počet. U volně žijícího kmene VAV1B je tvořena 7 mikrotubuly. U kmene MAREK2 jsme pozorovali v této fibrile minimálně 10 mikrotubulů. Jejich přesný počet se nám na našich řezech nepodařilo určit. U kmene NAU3 jsme ve fibrile R1 napočítali 8 mikrotubulů.

4.2.7. Mitochondrie

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) jsme v buňkách studovaných kmenů pozorovali velké množství měchýřků, ale nenalezli jsme žádné váčky obalené dvěma membránami, proto jsme je nemohli považovat za mitochondrii či hydrogenosom. Přítomnost mitochondrie u našich kmenů jsme tedy nepotvrdili.

Pozorované znaky jsou schematicky shrnuty ve zjednodušeném stromě (Obr. 17)

Obr. 17. Zjednodušený fylogenetický strom s pozorovanými znaky: levý sloupec – počet mikrotubulů ve fibrile R1 (v případě kmene POTCUPRI nevíme s jistotou, zda má 6 či 7 mikrotubulů), prostřední sloupec – umístění karyosomu, pravý sloupec – tvar buňky.



5. Diskuze

5.1. Sekvenace genu pro SSU rRNA

V rámci této diplomové práce jsme osekvenovali kmeny rodu *Monocercomonoides* MAREK2 a POTCUPRI. Vzorky DNA jsme získali izolací buněk ze stálých kultur vedených v naší laboratoři. Při amplifikaci genu pro SSU rRNA jsme se potýkali s problémy. Tyto prvky nelze zatím kultivovat jinak než polyxenicky, takže získaná DNA byla převážně bakteriální. Problémy při amplifikaci mohou souviset jednak s nízkým zastoupením DNA prvoků ve vzorku a pak s délkou genu pro SSU rRNA, který je u oxymonád dlouhý kolem 3000 párů bazí. Dalším významným faktorem při amplifikaci je specifita primerů, které v našem případě zřejmě dostatečně neupřednostňují gen pro SSU rRNA oxymonád. Z používaných primerů se nám nakonec nejvíce osvědčila kombinace primerů EK-42F a EK-1498R. Také úspěšnost použitých polymeráz se lišila. Nejdříve jsme používali *EmeraldAmp*® *MAX PCR Master Mix* a *PrimeSTAR*® *Max DNA* polymerázu, ale nejlepších výsledků jsme dosáhli s LA polymerázou.

5.2. Molekulární fylogenetika

Vnitřní vztahy mezi jednotlivými rody oxymonád nejsou zatím dokonale vyřešeny. Je však jisté, že sesterskou linií oxymonád je volně žijící rod *Trimastix*, a to jak na základě studií morfologických, identická struktura I fibrily (Simpson a kol., 2002), tak na základě studií fylogenetických (Dacks a kol., 2001). Díky přítomnosti „exkavátních“ znaků u trimastixe a jeho fylogenetické příbuznosti k oxymonádám jsou také oxymonády řazeny do říše Excavata. Z vnitřních vztahů v rámci oxymonád je dobře podpořen sesterský vztah mezi rody *Monocercomonoides* a *Streblomastix* a monofylie všech čeledí kromě Polymastigidae (Heiss a Keeling, 2006; Šrámová, 2012). Čeď Polymastigidae je morfologicky nejjednodušší a její morfologie je považována za pleziomorfní pro oxymonády (Moriya a kol., 2003).

Co se týče námi provedených fylogenetických analýz, sestavily jsme dva fylogenetické stromy. Jeden obsahoval pouze úplné sekvence námi sekvenované části genu pro SSU rRNA, do druhého jsme zahrnuli i rozpracované a tedy podstatně kratší sekvence. Topologie takto vytvořených stromů nebyly v rozporu, takže velké množství chybějících dat u některých kmenů neovlivňuje výsledky analýzy. Bez kmene NAU3 je rod *Monocercomonoides* dobře podpořený (83/1,00 a 96/1,00). Kmen NAU3 se větví jako sesterský rodu *Monocercomonoides* s velmi nízkou statistickou podporou (15/0,51 a 26/0,70). Je možné, že se jedná o nový rod oxymonády. Buňky tohoto kmene jsou menší než buňky ostatních kmenů a mají špičatý posteriorní konec. V kultuře NAU3 jsou však přítomny i trichomonády a je možné, že jsme je na protargolových snímcích zaměňovali s buňkami *Monocercomonoides*. Ultrastrukturu tohoto kmene se nám nepodařilo prostudovat, protože nemáme kvalitní fixaci s dostatečným počtem buněk. Jedna z kultur (NAU1) bohužel během naší práce zanikla.

Kmeny VAV1B a MAREK2 byly izolovány ze dvou dlouhodobě nepoužívaných septiků. Je tedy možné, že se jedná o volně žijící organismy, i když prostředí septiku může být považováno za přechod mezi střevem a okolním prostředím. Navíc nemůžeme vyloučit variantu, že se do septiku dostaly těsně před izolací z nějakého hostitele. Tyto kmeny mají různou pozici na stromě, a liší se i v některých morfologických znacích. Studium

ultrastruktury ukázalo, že kmen VAV1B má 6 mikrotubulů ve fibrile R1, zatímco fibrila kmene MAREK2 je tvořena 11 mikrotubuly. Domníváme se, že se nejedná o jeden druh a že oxymonády dvakrát nezávisle na sobě kolonizovaly toto prostředí. Kmeny získané z příbuzných hostitelů si jsou často příbuzné, např. kmeny POTCUPRI, EUDIA a ESMI získané z různých druhů zlatohlávků tvoří jeden klád (Obr. 3). Najdou se ale i opačné příklady, kdy je klád tvořen kmeny z velmi vzdálených druhů hostitelů, např. klád tvořený kmeny LEI, BOA a B1-10.

5.3. Morfometrie

Získali jsme rozměry 3 kmenů – TENE79, POTCUPRI a VAV1B. Zaznamenávali jsme délku a šířku buňky a jádra. Takto získané rozměry našich kmenů se od sebe výrazně nelišily (Tab. 16). Díky fylogenetické analýze však víme, že jsou tyto kmeny geneticky poměrně vzdálené, a liší se také v počtu mikrotubulů ve fibrile R1, takže předpokládáme, že se nebude jednat o stejný druh. Podstatná část publikovaných morfologických studií používala barvení Giemsou. Díky tomu nemůžeme námi získané rozměry s nimi srovnávat, protože buňky barvené Giemsou mají větší rozměry, neboť se při suchém roztěru roztáhnou. Barvení protargolem je však jinak vhodnější pro studium karyomastigontu a zachovává trojrozměrnost buněk. Od morfometrie jsme proto v této fázi ustoupili, ale uvědomujeme si, že pro přiřazení studovaných kmenů k popsaným druhům budeme muset v budoucnosti buňky změřit a to také na preparátech barvených Giemsou.

5.4. Morfologická studie

Provedli jsme morfologickou studii kmenů TENE79, POTCUPRI, VAV1B, MAREK2 a NAU3 pomocí světelné a transmisní elektronové mikroskopie. Pro vybrané kmeny jsme se rozhodli na základě toho, že pochází z nepříbuzných hostitelů a mají relativně vzdálené pozice na fylogenetickém stromě (Obr. 2, 3). Zjistili jsme, že námi studované kmeny dokážeme rozlišit podle polohy karyosomu, počtu mikrotubulů ve fibrile R1 a také tvaru buňky v případě kmene NAU3. Kmeny POTCUPRI a NAU3 mají centrální karyosom, ostatní studované kmeny jej mají parietální. Každý kmen se liší počtem mikrotubulů ve fibrile R1, který se pohybuje v rozmezí 6-12 mikrotubulů. Počítání mikrotubulů ve fibrile R1 je však trochu problematické. Je třeba najít přehledný příčný řez, na kterém lze mikrotubuly s jistotou rozpoznat a spočítat. Je možné, že počty mikrotubulů se mohou lišit podle toho, jak daleko od začátku této fibrily je řez proveden. Lze totiž předpokládat, že na začátku fibrily je přítomno více mikrotubulů, s rostoucím vzdáleností mohou ubývat. Proto je vhodné u každého kmene nalézt jednak řezy v anteriorní části R1, tedy na úrovni bazálních tělísek nebo jádra a pak řezy distálnější. Toto se nám zatím nepodařilo u všech kmenů. Množství dobrých řezů touto fibrilou se pohybovalo v rozmezí (3-6) a je tedy potřeba ještě prohlédnout další preparáty. V morfologických popisech druhů je jako další znak používána délka této fibrily v poměru k velikosti buňky a délka bičíků. I naše kmeny se v délce fibrily zřejmě liší, avšak vzhledem k malému počtu prohlédnutých buněk a různé kvalitě protargolového barvení si nedovolujeme zatím činit závěry. Bičíky na barvených preparátech protargolem nejsou dobře měřitelné, protože neleží v jedné rovině a tento znak tedy nemůžeme použít vůbec.

Ani protargolové barvení není zcela ideální, protože sebou přináší vznik specifických artefaktů. Morfologii jádra na protargolových preparátech lze špatně srovnat s elektronovou

mikroskopii nebo s živými buňkami, např. jádra u kmene VAV1B nabarvená protargolem mají silně barvený okraj. Domnívali jsme se, že se může jednat o vrstvu endoplazmatického retikula, které těsně přiléhá k jádru, toto však elektronová mikroskopie nepotvrdila a okraje jader tohoto kmene se na elektronové mikroskopii od ostatních nijak nápadně neliší. Co se týče pozorování buněk barvených protargolem a živých buněk, jejich karyosomy bývají větší než karyosomy pozorované elektronovou mikroskopii. Je třeba si uvědomit, že při transmisní elektronové mikroskopii se pozorují tenké řezy a pokud řez není veden středem jádra, tak se karyosom jeví menší. Také se nepodařilo všechny preparáty kvalitně a srovnatelně protargolem nabarvit. Výsledky barvení touto metodou, stejně jako u jiných metod, ovlivňuje řada faktorů, např. stav kultury a drobné rozdíly v podmínkách barvení. Proto by bylo dobré studované kmeny barvit opakovaně, což nebylo možné z časových důvodů.

Situace s kmenem NAU3 je zajímavá. V této kultuře žijí kromě oxymonád, které by podle pozorování živých buněk měly tvořit podstatnou část, také trichomonády. Víme to díky tomu, že se Mgr. Pavle Smejkalové podařilo z DNA z této kultury opakovaně osekvenovat gen pro 18S rRNA nové linie trichomonád. Na preparátech barvených protargolem se vyskytují buňky dvojího typu, s tmavě barvenou a slaběji barvenou cytoplazmou, a je tedy možné, že jedny z nich mohou být tyto trichomonády, i když nápadné znaky trichomonád (undulující membránu, kostu, výrazný axostyl, přišpičaté jádro) nevykazují (Obr. 8 D, E). Buňky na preparátech z této kultury jsou celkově menší než buňky ostatních kmenů a jejich posteriorní konec je špičatější. Na preparátech pro elektronovou mikroskopii bylo přítomno velmi málo buněk, ale všechny vykazovaly jasné znaky oxymonád – přítomnost preaxostylu a fibrily R1. Není vyloučeno, že naše závěry ohledně morfologie NAU3 jsou ovlivněny tím, že v některých případech pokládáme za oxymonády buňky trichomonád.

Kvalita fixace na elektronovou mikroskopii se také velmi lišila mezi kmeny. Nejlépe se chemickou fixací nafixovaly kmeny TENE79 a POTCUPRI, jejichž preparáty obsahovaly nejvíce buněk a ty byly dobře zachovány. U kmenů VAV1B, MAREK2 a NAU3 byla kvalita chemické fixáže podstatně horší a preparáty obsahovaly malé množství buněk. Rozdíly mezi Karnovského fixací a 2,5% glutaraldehydem v kakodylátovém pufru nebyly nijak patrné. Proto jsme kmeny MAREK2 a NAU3 fixovaly také pomocí kryosubstituce. Kvalita těchto vzorků také nebyla dobrá, ale v případě kmene NAU3 byly fotografie buněk takto nafixovaných jako jediné použitelné. V budoucnu bude potřeba najít optimální podmínky fixace dalších kmenů např. změnou pufru ve fixační směsi.

Jak bylo diskutováno výše, našli jsme několik znaků teoreticky použitelných pro rozlišování kmenů *Monocercomonoides*. Domníváme se, že tyto znaky mohou být dobrými rozlišovacími znaky, nevíme však zatím, nakolik jsou tyto znaky stabilní. Pro ověření stability těchto znaků bude v budoucnu potřeba zjistit situaci u dalších více či méně příbuzných kmenů a prohlédnout více, nejlépe seriálních, řezů fibrily R1.

5.5. Druhy *Monocercomonoides*

Na základě naší fylogenetické analýzy i morfologických pozorování se domníváme, že kmeny TENE79, POTCUPRI, VAV1B a MAREK2 jsou různými druhy rodu *Monocercomonoides*. V případě kmene NAU3 se na základě jeho fylogenetického postavení i odlišného vzhledu

domníváme, že se může jednat dokonce o jiný rod oxymonády. K popisu nového rodu však bude nezbytné provést důkladnou studii pomocí elektronové mikroskopie. Přiřazení našich kmenů k již existujícím druhům rodu *Monocercomonoides* nebude jednoduché. Starší popisy druhů jsou založeny jen na barvených preparátech, navíc většinou barvených Giemsou. Determinačními znaky jsou často rozměry buněk, ty však jsou obtížně srovnatelné díky jiné metodě barvení (Giemsa/protargol) a tudíž je vlastně nemůžeme pro přiřazení ke druhu použít. I kdybychom pro srovnání provedli barvení Giemsou a určili rozměry takto barvených buněk, lze očekávat, že se budou nacházet v rozmezí rozměrů mnoha popsáných druhů. Dále jsou druhy popisovány na základě délky a tloušťky bičíků, počtu předních a zpětných bičíků, počtu fibril R1, polohy axostylu (zda vybíhá), umístění a tvaru karyosomu (Krishnamurthy, 1967; Navarathnam, 1970). Z časových důvodů jsme se příliš nezabývali znaky jako délka a tloušťka bičíků a tloušťka axostylu a měli bychom k nim v budoucnu také přihlížet. V novějších studiích (Radek, 1994) se kromě barvených preparátů věnují i elektronové mikroskopii, přesto barvení a světelná mikroskopie zůstává základní metodou pro porovnávání druhů. Domníváme se, že v budoucnu by se při determinaci mělo přihlížet i k elektronové mikroskopii a zaměřit se na stavbu fibrily R1, polohu karyosomu, případně pozorovat i přítomnost a umístění chromatinových granulí v jádře.

Posledním vodítkem je druh hostitele. Hostitelská specifita druhů rodu *Monocercomonoides* však může být velice variabilní a jednotlivé druhy nemusí být striktně hostitelsky specifické. Jak je vidět z fylogenetického stromu (Obr. 3), některé kmeny z příbuzných hostitelů tvoří jednu skupinu (POTCUPRI, EUDIA, ESMI), ale jindy tvoří dobře podpořenou skupinu kmeny izolované z hostitelů velmi vzdálených, např. kmeny LEI (leguánek), BOA (hroznýš) a B1-10 (tur). Je také možné, že v jednom hostiteli může být přítomno více druhů těchto oxymonád.

Naše analýzy ukázaly, že námi studované kmeny TENE79, POTCUPRI, VAV1B, MAREK2 a NAU3 si jsou geneticky poměrně vzdáleny, liší se v morfologii jádra, struktuře fibrily R1, tvaru buňky a navíc víme, že byly získány z různých hostitelů. Na základě těchto informací usuzujeme, že se jedná o různé druhy, i když nemusí být nutně druhy novými.

6. Závěry

- Podařilo se získat sekvence genu pro SSU rRNA z kmenů POTCUPRI a MAREK 2. Fylogenetická analýza ukázala dobře podpořenou monofylii rodu *Monocercomonoides* (bez kmenů NAU1 a NAU3) a nepříbuznost volně žijících kmenů VAV1B a MAREK2. Kmeny NAU1 a NAU3 se větvaly jako sesterké ostatním kmenům *Monocercomonoides* s nízkou podporou.
- Studované kmeny jsme byli schopni rozlišit na základě umístění karyosomu (centrální nebo parietální), počtu mikrotubulů ve fibrile R1 (6-12 mikrotubulů), případně velikosti a tvaru buňky u kmene NAU3. Domníváme se, že všech 5 studovaných kmenů představuje různé druhy, nebyli jsme je však schopni zatím přiřadit k již popsaným druhům. Kmen NAU3 je natolik fylogeneticky a morfologicky odlišný, že je možné, že se jedná o jiný rod oxymonády.
- V žádném z pěti studovaných kmenů jsme nepozorovali přítomnost mitochondrií ani jiných organel obalených dvěma membránami.

7. Seznam zkratek

ATP- adenosintrifosfát

GA- glutaraldehyd

rpm- „rotation per minute“, otáčky za minutu

SSU rRNA – RNA malé podjednotky ribosomu

TEM- transmisní elektronová mikroskopie

8. Seznam literatury

Převzatá citace je označena *

Abraham R., 1961. A description of *Monocercomonoides sayeedi* n. sp., from the rumen of an indian goat. Z f Parasitenkunde 20, 558-562.

Bloodgood RA., Miller KR., Fitzharris TP., McIntosh JR., 1974. The Ultrastructure of *Pyrsonympha* and its associated microorganisms. J Morphol 143, 77-105.

Brugerolle G., 1980. Etude ultrastructure du flagellé parasite *Polymastix melolonthae* (Oxymonadida). Protistol 17, 139-145

Brugerolle G., König H., 1997. Ultrastructure and organization of the cytoskeleton in *Oxymonas*, an intestinal flagellate of termites. J Euk Microbiol 44, 305-313.

Brugerolle G., Patterson D., 1997. Ultrastructure of *Trimastix convexa* Hollande, an amitochondriate anaerobic flagellate with a previously undescribed organization. Europ J Protistol 33, 121-130.

Brugerolle G., Müller M., 2000. Amitochondrial flagellates. In: Leadbeater BSC., Green JC. (eds) The flagellates: unity, diversity and evolution. Taylor and Francis, London, 166-189.

Brugerolle G., Lee JJ., 2002. Order Oxymonadida. In: Lee, J. J., Leedale, G., F., Bradbury, P. (ed.), An Illustrated Guide To The Protozoa. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, USA. 1186-1195.

Cavalier-Smith T., 2003. The excavate protozoan phyla Metamonada Grasse' emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozooa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their evolutionary affinities and new higher taxa. Int J Syst Evol Microbiol 53, 1741-1758.

Carpenter KJ., Waller RF., Keeling PJ., 2008. Surface Morphology of *Saccinobaculus* (Oxymonadida): Implications for Character Evolution and Function in Oxymonads. Protist, 159, 209-221.

Cleveland LR., 1950. Hormone-induced sexual cycles of flagellates: II. Gametogenesis, fertilization, and one-division meiosis in *Saccinobacullus*. J Morphol, 86, 215-228.

Cleveland LR., 1966. Nuclear division without cytokinesis followed by fusion of pronuclei in *Paranotila lata* gen. et sp. nov. J Protozool, 13, 132-136.

Cross JB., 1946. The flagellate subfamily Oxymonadidae. Univ Calif Publ Zool 53, 67-162.

Dacks JB., Silberman JD., Simpson GB., Moriya S, Kudo T, Ohkuma M and Redfield RJ., 2001. Oxymonads Are Closely Related to the Excavate Taxon *Trimastix*. Mol Biol Evol 18, 1034-1044.

Duboscq O., Grassé PP., 1925. Note sur les protistes des termites de France. IV. Appareil de Golgi, mitochondries et vesicules sousflagellaires sousflagellaires de *Pyrsonympha vertens* Leidy. C. R. Soc Biol 93, 345–347.

Duboscq O., Grassé PP., 1934. Sur *Microrhopalodina inflata* (Grassi). Arch Zool Exp Gén 75, 615-637.

*Grassé PP., 1926. Contribution à l'étude des Flagellés parasites. Arch Zool Exp Gén Paris 65, 342–602.

Grassé PP., 1952. Famille des Polymastigidae, Orde des Pyrsonymphines, Ordre des Oxymonadides. Traité de Zoologie, Vol. I., 780-823.

de Koning AP., Noble GP., Heiss AA., Wong J, Keeling PJ., 2008. Environmental PCR survey to determine the distribution of a non-canonical genetic code in uncultivable oxymonads. Environ Microbiol 10, 65-74.

Hall TA., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 41, 95-98.

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. Mol Biol Evol 22, 2508-2518.

Hausmann K., Hülsmann N., Radek P., 2003. Protistology. 3rd completely revised edition. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Berlin, Stuttgart, hardback, 379.

Heiss AA., Keeling PJ., 2006. The Phylogenetic Position of the Oxymonad *Saccinobaculus* Based on SSU rRNA. Protist, 157, 335-344.

Hongoh Y., Sato T., Noda S, Ui S., Kudo T., Ohkuma M., 2007. Candidatus *Symbiothrix dinenymphae*: bristle-like Bacteroidales ectosymbionts of termite gut protists. Environ Microbiol 9, 2631-2635.

Huelsenbeck JP., Ronquist F., 2001. MRBAYES: Bayesian Inference of Phylogenetic Trees. Bioinfo 17, 754-755

Kofoid CA., Swezy O., 1919. Studies on the parasites of the termites I. On *Streblomastix strix*, a polymastigote flagellate with a linear plasmodial phase. Univ Cali Publ Zool 20, 1-20.

Kulda J., Nohynkova E., 1978. Flagellates of the Human Intestine and of Intestine of Other Species. In J.P. Kreier (ed): Parasitic Protozoa. Academic Press, New York 2, 1-138.

Krishnamurthy R., 1967. Two new species of the genus *Monocercomonoides* Travis, 1932 (Protozoa: Mastigophora) from reptiles. Proc Ind Acad Sc, 66, 184-191.

Krishnamurthy R., Sultana T., 1975. The Morphology of *Monocercomonoides chakravartii* n. sp. (Protozoa: Mastigophora) from the gut of the insect Polyphaga indica. Curr Sc, 45, 184-185.

- Krishnamurthy R. and Madre VE., 1979. Studies on Two Flagellates of the Genus *Monocercomonoides* Travis, 1932 (Mastigophora: Polymastigina) from Amphibian and Reptiles in India. *Acta Protozool*, 18, 251-257.
- Krishnamurthy R., Sultana T., 1980. The description of a new flagellate *Monocercomonoides spirotreptae* sp. n. (Mastigophora, Oxymonadida), from the millipedes in Maharashtra, India. *Acta Parasitol Polon*, 27, 257-260.
- Lee JJ., Leedale GF., Bradbury PC., 2000. *Illustrated Guide To The Protozoa*, Volume 1, Second edition. Wiley-Blackwell, 1188-1191.
- *Leidy J., 1881. The parasites of termites. *J Acad Nat Sci Philad series 2*, 8, 425–447
- Mali M., Kulkarni S., Mali S., 2001. Two species of flagellates of the genus *Monocercomonoides* Travis, 1932 from the gut of dung beetle larva (*Oryctes rhinoceros*) in India. *GEOBIOS* 28, 201-204.
- Mali M. and Patil G, 2003. The Morphology of *Monocercomonoides aurangbadae* n. sp. A lagellata from the gut of *Blatta germanica*. *Uttar Pradesh J Zool*, 23, 117-119.
- Mali M. and Mali S., 2004. The *Monocercomonoides khutabadae* n. sp., a new flagellate from the gut of *Pycnoscelus surinamensis*. *Uttar Pradesh J Zool*, 24, 55-58.
- Moriya S., Dacks JB., Takagi A., Noda S., Ohkuma M. , Doolittle WF. and Kudo T, 2003. Molecular Phylogeny of Three Oxymonad Genera: *Pyrrsonympha*, *Dinenympha* and *Oxymonas*. *J Euk Microbiol*, 50, 190-197.
- Moskowitz N, 1951. Observations on Some Intestinal Flagellates from Reptilian Host (Squamata). *J Morphol*, 89, 257-321.
- Navarathnam ES., 1970. On two new species of intestinal flagellates of the gerbil, *Gerbillus indicus*. *Riv Parassitol*, 21, N. 3.
- Navarthnam ES., 1970. Intestinal flagellates of the common Indian rat *Rattus rattus frugivorous*. *Acta Protozool*, 8, 155-165.
- Nie D., 1950. Morphology and taxonomy of the intestinal protozoa of the guinea-pig, *Cavia porcella*. *J Morphol*, 86, 381–493.
- Noda S., Inoue T., Hongoh Y., Kawai M., Nalepa CA., Vongkaluang C., Kudo T., Ohkuma M., 2006. Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in *Bacteroidales* attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood-feeding cockroach. *Environ Microbiol* 8, 11-20.
- O'Kelly CJ., Farmer MA., Nerad TA., 1999. Ultrastructure of *Trimastix pyriformis* (Klebs) Bernard et al.: similarities of *Trimastix* species with retortamonad and jakobid flagellates. *Protist*, 150, 149–162.

- Radek R., 1994. *Monocercomonoides termitis* n. sp, an Oxymonad from the lower termite *Kaloterme sinicus*. Arch Protistenkd, 144, 373-382.
- Radek R., 1997. *Monocercomonoides hausmanni* nom. Nov. A New Species Name for *M. termitis* Radek, 1994. Arch Protistenkd, 147, 411.
- Radek R., Strassert JH., Krüger J, Meuser K, Scheffrahn RH. and Brune A, 2014. Phylogeny and Ultrastructure of *Oxymonas jouteli*, a Rostellum-free Species, and *Opisthomitus longiflagellatus* sp. nov., Oxymonadid Flagellates from the Gut of *Neotermes jouteli*. Protist, 165, 384-399.
- Rao TB., 1969. The Morphology and Incidence of the Genus *Monocercomonoides* (Grassi, 1879) Travis 1932 of Insects Found Andhra Pradesh, Indica. Proc Ind Acad Sc - B, 70, 208-214.
- Simpson AGB., Bernard C., Patterson DJ. (2000) The ultrastructure of *Trimastix marina* Kent, 1880 (eukaryota), an excavate flagellate. Europ J Protistol 36, 229–251.
- Simpson AGB., Radek R., Dacks JB., O'Kelly CJ., 2002b. How Oxymonads Lost Their Groove: An Ultrastructural Comparison of *Monocercomonoides* and Excavate Taxa. J. Eukaryot Microbiol, 49, 239-248.
- Stamatakis A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics, 22, 2688-2690.
- Stingl U., Brune A., 2003. Phylogenetic Diversity and Whole-Cell Hybridization of Oxymonad Flagellates from the Hindgut of the Wood-Feeding Lower Termite *Reticulitermes flavipes*. Protist, 154, 147–155.
- Sultana T. and Krishnamurthy R., 1978. *Monocercomonoides gryllusae* n. sp. (Mastigophora: Oxymonadida) from *Gryllus bimaculatus*. GEOBIOS, 5, 114-115.
- Šrámová E., 2012. Evoluce genetického kódu a taxonomie oxymonád. Diplomová práce. Katedra parazitologie, PřF UK.
- Todd SR ., 1963. Studies on some parasitic flagellates of certain wild mammals of Hyderabad. Arch Protistenkd, 107, 1-116.