

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra parazitologie



**Ekologie a biodiverzita jednohostitelských trypanosomatid  
u ploščic na území ČR**

Helena Klepetková

Školitel: RNDr. Jan Votýpka, PhD.  
Školitel specialista: Mgr. Petr Kment, PhD.

2010

Diplomová práce

Moje největší díky patří nepochybně mému školiteli RNDr. Janu Votýpkovi, PhD., který nese na vzniku této práce obří podíl. Děkuji za jeho cenné rady, pracovní nadšení a motivaci. Za zasvěcení do tajů plošticovědy děkuji Mgr. Petru Kmentovi, PhD. Také bych ráda poděkovala všem, co se aktivně zapojili do lovu ploštic. Za podporu (nejen psychickou) děkuji všem svým kamarádům a hlavně rodině.

Prohlašuji, jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

V Praze 1.9.2010

.....  
Helena Klepetková

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>7</b>
2.1	Obecná charakteristika kinetoplastid.....	7
2.2	Stručný přehled znaků trypanosomatid .....	8
2.3	Morfologická stádia.....	13
2.4	Klasická taxonomie a její problematika.....	15
2.5	Ploštice (Heteroptera) jako hostitelé monoxenních trypanosomatid.....	20
2.6	Lokalizace a interakce jednohostitelských trypanosomatid s plošticím hostitelem.....	26
2.7	Distribuce a hostitelská specifita jednohostitelských trypanosomatid .....	28
2.8	Cesty přenosu jednohostitelských trypanosomatid .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>40</b>
3.1	Odchyt ploštic .....	40
3.2	Pitva ploštic .....	40
3.3	Určení ploštic do druhů.....	40
3.4	Izolace a kultivace trypanosomatid .....	41
3.5	Kryoprezervace kultur .....	43
3.6	Barvení buněk dle Giemsy-Romanovského .....	43
3.7	Měření buněk .....	43
3.8	Elektronová mikroskopie.....	44
3.9	Molekulární a fylogenetické analýzy .....	45
3.9.1	<i>Izolace DNA z buněk trypanosomatid .....</i>	<i>45</i>
3.9.2	<i>Analýza RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....</i>	<i>45</i>
3.9.3	<i>Amplifikace genu pro SSU rRNA trypanosomatid.....</i>	<i>46</i>
3.9.4	<i>Amplifikace genu pro gGAPDH .....</i>	<i>47</i>
3.9.5	<i>Amplifikace genu pro SL RNA.....</i>	<i>48</i>
3.9.6	<i>Elektroforéza a izolace DNA z gelu.....</i>	<i>49</i>
3.9.7	<i>Klonování SL DNA a izolace plasmidů .....</i>	<i>49</i>
3.9.8	<i>Sekvenační reakce.....</i>	<i>52</i>
3.9.9	<i>Vyhodnocení sekvencí a tvorba aligmentů .....</i>	<i>53</i>
3.9.10	<i>Tvorba fylogenetických stromů.....</i>	<i>57</i>
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>58</b>
4.1	Studium jednohostitelských trypanosomatid ploštic v České republice .....	58
4.1.1	<i>Vyšetření odchycených ploštic.....</i>	<i>58</i>
4.1.2	<i>Izolace trypanosomatid a jejich kultivace .....</i>	<i>61</i>
4.1.3	<i>Charakter infekce u ploštic.....</i>	<i>62</i>
4.1.4	<i>Molekulární analýzy jednotlivých izolátů.....</i>	<i>62</i>
4.1.5	<i>Rozdělení českých izolátů do skupin.....</i>	<i>66</i>

<b>4.2</b>	<b>Vzorky z Francie, Sicílie a Ghany .....</b>	<b>67</b>
4.2.1	<i>Analýza jednotlivých vzorků .....</i>	70
4.2.2	<i>Rozdělení izolátů do skupin .....</i>	72
<b>4.3</b>	<b>Fylogenetické analýzy .....</b>	<b>75</b>
<b>4.4</b>	<b>Rozšíření a specifita druhu <i>Leptomonas pyrrocoris</i> .....</b>	<b>87</b>
4.4.1	<i>Výsledky sekvenační a RAPD analýzy .....</i>	87
4.4.2	<i>Morfologie buněk.....</i>	91
4.4.3	<i>Morfologie kinetoplastu.....</i>	97
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>99</b>
5.1	<b>Trypanosomatida českých ploštic .....</b>	<b>99</b>
5.2	<b>Kultivace trypanosomatid.....</b>	<b>100</b>
5.3	<b>Lokalizace infekce v ploštici .....</b>	<b>102</b>
5.4	<b>Fylogenetické analýzy .....</b>	<b>103</b>
5.5	<b>Geografické rozšíření v závislosti na hostitelské specifitě .....</b>	<b>110</b>
5.6	<b>Přenos jednohostitelských trypanosomatid .....</b>	<b>113</b>
5.7	<b>Morfologie druhu <i>Leptomonas pyrrocoris</i> .....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY.....</b>	<b>119</b>

# 1 ÚVOD

Do řádu Kinetoplastida náleží velmi početná a značně diverzifikovaná skupina jednohostitelských trypanosomatid. U těchto parazitických prvoků nalezneme řadu pozoruhodných a jedinečných znaků, které fascinují vědce již po dlouhou dobu a díky nimž patří mezi jedny z nejstudovanějších organismů. Jejich význam souvisí i s příbuzností s dvouhostitelskými trypanosomatidy – významnými patogeny člověka, zvířat i rostlin. Současně však právě díky dixenním druhům zůstávala jednohostitelská trypanosomatida dlouhou dobu opomíjena. V poslední době se však ukazuje, že i studium těchto parazitů hmyzu by mohlo přinést zajímavé poznatky potencionálně využitelné v boji s nemocemi působenými patogenními rody. Jejich studiem by se také mohla osvětlit fylogeneze celé skupiny kinetoplastid a objasnit původ a vznik dvouhostitelských životních cyklů. Téměř nic není známo o ekologické valenci, hostitelské specifitě a geografickém rozšíření a právě vytvoření dostatečně velkého souboru dat je důležitým předpokladem pro studium zmíněných charakteristik.

K nejstudovanějším skupinám hostitelského hmyzu monoxenních trypanosomatid patří ploštice a dvoukřídlí. V nedávné době se ale prokázalo, že i blechy jsou často parazitovány, avšak opomíjenou skupinou hostitelů (Duží, 2007; Suková, 2009). Detailní průzkum biodiverzity trypanosomatid u ploštic proběhl v oblastech Jižní Ameriky a Asie (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010), kde bylo objeveno mnoho nových, dosud nepopsaných druhů, což mimo jiné dokazuje, že variabilita trypanosomatid bude nečekaně veliká a její značná část bude dosud nepoznána.

Proto jsem se ve své diplomové práci zaměřila na průzkum výskytu trypanosomatid u ploštic na českém území. Jednotlivé izoláty byly charakterizovány převážně molekulárně-fylogenetickými metodami, které nám pomohly odhalit fylogenetické vztahy mezi novými a již popsány druhy. Vzhledem k tomu, že kromě českých izolátů byly získány i mnohé další z oblastí jižní Evropy a Afriky, mohla být soustředěna naše pozornost na celkové geografické rozšíření. Problematika hostitelské specifity je značně kontroverzní a dosud nebyla zdaleka vyřešena. Také přenos jednohostitelských trypanosomatid mezi hostiteli zůstává nedořešen a bylo popsáno několik způsobů, které zahrnují šíření v prostředí kontaminovaném infekčními stádii, koprofágií a kanibalismus. Dlouhodobé studium výskytu trypanosomatid u ploštic na jedné lokalitě i srovnání různých, geograficky vzdálených oblastí, se jeví jako slibná cesta, jak se pokusit řešit tuto problematiku. Vzhledem k množství plošticích izolátů zahrnutých v naší studii mohly být otázky týkající se geografického rozšíření, hostitelské specifity a přenosu alespoň zčásti zodpovězeny. Zvláštní pozornost ohledně geografického rozšíření i hostitelské specifity byla věnována druhu *Leptomonas pyrrhocoris*, který se vyskytuje u ploštic čeledi Pyrrhocoridae.

## Cíle práce

- zjistit prevalenci, diverzitu, geografickou závislost a hostitelskou specifitu trypanosomatid ploštic
- molekulárně-fylogenetická analýza získaných izolátů
- popis způsobu přenosu trypanosomatid mezi hostitelským hmyzem
- morfologická a fylogenetická analýza různých izolátů druhu *Leptomonas pyrrhocoris*

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Obecná charakteristika kinetoplastid

Kinetoplastida jsou vskutku pozoruhodná skupina protist, u nichž nalezneme spoustu zvláštností zahrnující unikátní architekturu mitochondriální DNA, komplexní RNA editing, trans sestřih všech mRNA, uspořádání genů do obrovských polycistronů, kompartmentalizaci glykolýzy a další.

Kinetoplastida se spolu s euglenidy a diplomemidy řadí do exkavátního kmene Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981). Dle molekulárně-fylogenetických analýz vycházejících ze sekvencí genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) se jedná o extrémně starobylou linii organismů, která se oddělila od prapůvodních eukaryot záhy poté, co tito získali mitochondrii (Schlegel, 1994). Kompozicí je třída Kinetoplastea (Cavalier-Smith, 1981) ekvivalentní k řádu Kinetoplastida (Honigberg, 1963) z předešlé klasifikace. Tato třída se tradičně rozdělovala dle morfologických charakteristik na dvě čeledi – Trypanosomatidae a Bodonidae (Vickerman, 2000). U bodonidů nalezneme dva heterodymanické bičíky, přičemž jeden může být přichycen k buňce prvoka. Trypanosomatida disponují jedním bičkem, ovšem druhý kinetosom zůstává zachován. Tyto dvě skupiny se liší nejen morfologicky, ale také životními strategiemi. Většina druhů z čeledi Bodonidae jsou volně žijící organismy (rody *Bodo*, *Parabodo*, *Rhynchomonas*, *Rhynchobodo*, *Procryptobia* a *Dimastigella*), v této skupině však nalezneme i ektokomensální (rod *Cephalothamnium*) či parazitické zástupce ryb i bezobratlých (rody *Ichtyobodo*, *Cryptobia* a *Trypanoplasma*). Naopak čeleď Trypanosomatidae zahrnuje pouze obligátně parazitické prvoky. Kritérium pro základní dělení trypanosomatid je životní cyklus. Podle něj se rozlišují rody jednohostitelské (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Rhynchoidomonas*, *Sergeia* a *Wallaceina*) a dvouhostitelské (*Endotrypanum*, *Leishmania*, *Phytomonas* a *Trypanosoma*). Esenciálním prvkem všech životních cyklů je bezobratlý živočich, který zde plní roli jediného hostitele nebo přenašeče u rodů dvouhostitelských, u nichž pak roli druhého hostitele hraje rostlina nebo obratlovec, a to včetně člověka.

V současnosti byl navržen nový systém kinetoplastid, který vzešel z molekulárně-fylogenetických analýz některých genů (malá ribosomální podjednotka, proteiny teplotního šoku). Klasická taxonomie založená na morfologii byla zpochybněna faktem, že čeleď Trypanosomatidae se vyčleňuje uvnitř bodonid, následkem čehož Bodonidae netvoří monofyletickou skupinu (Callahan a kol., 2002; Simpson a kol., 2002). Podle těchto studií se třída Kinetoplastea rozdělila na dvě podtřídy – Prokinetoplastina a Metakinetoplastina

(Moreira a kol., 2004, Simpson a kol., 2006). Prokinetoplastina zahrnují bazální organismy k ostatním kinetoplastidům – rod *Ichtyobodo* parazitující na povrchu ryb (Callahan a kol., 2002) a jeho blízce příbuzný rod *Perkinsiella* (Dyková a kol., 2003), což je endosymbiont některých druhů améb. Podtřída Metakinetoplastina zahrnuje čtyři nově vytvořené řády – Neobodonida (zahrnující rody *Neobodo*, *Dimastigella*, *Rhynchomonas*), Parabodonida (rody *Parabodo*, *Cryptobia*, *Procryptobia*), Eubodonida (rod *Bodo*) a Trypanosomatida. Řád Trypanosomatida v tomto novém systému koresponduje přesně s čeledí Trypanosomatidae z předchozí klasifikace. Ovšem bývalá čeleď Bodonidae byla nově rozdělena do několika monofyletických skupin.

Pozoruhodné je umístění monofyletické skupiny Trypanosomatida v rámci podtřídy Metakinetoplastina. Diskutabilní je totiž otázka, která skupina bodonid je nejbližší trypanosomatidům. Dle fylogenetických analýz založených na sekvencích SSU rRNA se tato linie odlučuje bazálně od apikálních bodonidů (Moreira a kol., 2004; Stoeck a kol., 2005), ovšem dle fylogenetických stromů vytvořených ze sekvencí „heat shock“ proteinů (HSP 70 a HSP 90) se trypanosomatida nacházejí uvnitř bodonidů ze skupiny Metakinetoplastina (Simpson a kol., 2004). Pro porozumění evoluce trypanosomatid je rozhodující zjištění, že druh *Bodo saltans* je bližší příbuzný trypanosomatidům než jiným bodonidům (Blom a kol., 1998).

## 2.2 Stručný přehled znaků trypanosomatid

Prvoci ze skupiny Kinetoplastida vynalezli mnoho unikátních cest k vybudování svých důležitých buněčných struktur nebo k provedení molekulárních pochodů nezbytných k jejich přežití. Některé znaky (buněčná organizace, polycistronický přepis genů, trans-sestřih, RNA editing) sdílejí tyto organismy s jinou skupinou prvoků – s dinoflageláty (Alveolata). Tyto skupiny organismů mají zřejmě podobnou evoluční historii, během které vynalezly podobné mechanismy avšak jinou cestou vývoje, tzv. konvergentní evolucí (Lukeš a kol., 2009).

Tvar buňky kinetoplastid podporuje **cytoskelet** z kortikálních mikrotubulů. Tato korzetu podobná struktura je více vyvinuta u parazitických druhů a u trypanosomatid, kde tvoří úplnou podporu buněčného povrchu kromě oblasti charakteristické flagelární kapsy. Tato struktura je zřejmě jediná oblast, která komunikuje s vnějším prostředím. Probíhá zde endocytóza i exocytóza makromolekul a dochází zde k vkládání nových komponent povrchu. Kinetoplastida, stejně jako Euglenida, jsou v základním stavu dvoubičkatí prvoci. Bičík vybíhá z flagelární kapsy a je důležitým orgánem pohybu. Podél axonemální struktury (9 + 2) probíhá paraflagelární tyčinka. V některých případech může být vytvořena undulující



membrána nebo se bičík může přeměnit na orgán přichycení k tkáním hostitele (Tieszen a kol., 1986; Schaub a kol., 1992).

Tyto organismy našly též originální způsob modifikace vlastní mitochondrie. V buňce nalezneme jenom jedinou značně velkou mitochondrii s mitochondriální DNA (mtDNA), která patří mezi nejlépe prostudované DNA organel. DNA je uspořádaná do komplexní trojrozměrné struktury v oblasti, tzv. **kinetoplastu**. Tato výrazná struktura je umístěna na ustáleném místě v matrix mitochondrie v blízkosti bazálního tělíska bičíku. Kinetoplastová DNA (kDNA) je tvořena sítí kroužků dvojího typu – maxikroužků a minikroužků. **Maxikroužky** se vyskytují v počtu několika desítek identických kopií, jejich velikost se v závislosti na druhu pohybuje mezi 20 – 40 kb. Sekvenčně heterogenních **minikroužků** se v kinetoplastu nachází několik tisíc. Velikost minikroužků je druhově specifická a jejich délka je v rozsahu 0,5 – 10 kb (shrnul Lukeš a kol., 2002). Maxikroužky jsou obdobou mitochondriální DNA ostatních eukaryot a kódují geny esenciální pro biogenezi mitochondrie, geny pro mitochondriální ribosomální RNA a podjednotky některých proteinů zapojených do transportu elektronů a syntézy ATP (Vickerman, 1994). Všechny kódující sekvence jsou koncentrovány v konzervativním regionu, což je souvislá část maxikroužku o velikosti 17 kb. Zbývá část se nazývá divergentní region a je složený z opakujících se sekvencí variabilní struktury a komplexity (viz Lukeš a kol., 2005). Minikroužky obsahují sekvence pro pomocné tzv. „guide“ RNA (gRNA), což jsou malé molekuly RNA nezbytné při procesu editace mRNA (viz dále) (Vickerman, 1994). Bylo však prokázáno, že ne všechny minikroužky obsahují sekvence pro gRNA (Gao a kol., 2001) a pravděpodobně plní funkci jisté podpory celé struktury kinetoplastu.

Nejlépe prostudovaná struktura kinetoplastu je u druhu *Crithidia fasciculata* (Shapiro a Englund, 1995). U tohoto modelového organismu je kinetoplastová DNA tvořena z 25 maxikroužků a 5 000 minikroužků. Všechny kroužky jsou katenovány do jedné ohromné sítě, která svým vzhledem připomíná středověkou železnou košili. Každý minikroužek je propojen s trojicí sousedních kroužků. Maxikroužky jsou také vzájemně propojeny mezi sebou a tvoří tak síť propletenou do sítě minikroužků (Shapiro, 1993).

Výše popsaný tvar a struktura kinetoplastové DNA se také označuje jako eukinetoplast, který nalezneme u všech trypanosomatid a je také nejlépe charakterizovanou strukturou kDNA. Ovšem tvar a struktura kinetoplastové mtDNA může být různorodá v rámci organismů ze skupiny Kinetoplastida. Volně žijící druh *Bodo saltans* disponuje pro-kDNA, což je jednoduché densní tělísko obsahující nekaténované kroužky. Volné a zároveň velké seskupení monomerních kroužků, jenž vyplňují většinu mitochondrie je typické pro pan-kDNA (např. *Bodo caudatus* a *Cryptobia helicis*). Poly-kDNA sestává z monomerních

kroužků zabalených do mnohočetných shluků, které jsou rozptýleny v celém mitochondriálním lumen. Toto uspořádání bylo popsáno u *Dimastigella mimosa*, *D. trypaniformis* a *Cruzella marina*. Posledním typem kDNA je mega-kDNA u rodu *Trypanoplasma* a *Jarellia*. Tato struktura je charakterizována tandemově uspořádanými minikroužky, které jsou rovnoměrně rozloženy v lumen mitochondrie (shrnul Lukeš a kol., 2002). Nejen kinetoplastida mají podivné uspořádání mitochondriální DNA, zvláštnosti ve struktuře mtDNA nalezneme i u jiných Euglenozoí (Roy a kol., 2007).

Pro replikaci této komplikované struktury se vyvinul velice sofistikovaný mechanismus, který zahrnuje soubor proteinů situovaných do určitých míst obklopujících kDNA. Důležitým momentem během procesu replikace je správné rozdělení kroužků do dvou kompletních disků a jejich následné přiřazení do dceřiných buněk, což je zprostředkováno pomocí propojení disků s basálními tělísky nově vzniklých bičíků (Robinson a Gull, 1991; Liu a kol., 2005).

Velkou pozornost též vzbuzuje proces **RNA editingu** probíhající v mitochondrii kinetoplastid. Během RNA editingu dochází k opravám chyb v genech kódovaných maxikroužky. Tyto opravy zahrnují inserce/deleci uridinu ve specifických editovaných místech transkriptu určených pomocí informace v sekvenci gRNA. Každou gRNA můžeme rozlišit na tři rozdílné oblasti lišícími se svou funkcí a obsahem. 5' konec hybridizuje s komplementární sekvencí pre-editované mRNA, zatímco následující úsek (downstream) obsahuje informaci RNA molekuly a slouží jako templát pro inserci/deleci uridinu v rozpoznávané RNA. 3' konec gRNA je složen z posttranskripčně přidaného oligo-U-ocásku, který by měl sloužit ke stabilizaci počátečního hybridu gRNA-preeditovaná mRNA. Proces RNA editingu je připisován 20S editosomu, což je multiproteinový komplex skládající se z několika proteinů (shrnutí Lukeš a kol., 2005; Stuart a kol., 2005). V tomto komplexu nalezneme všechny potřebné katalytické aktivity nezbytné pro rozstřížení pre-mRNA, adici nebo deleci uridinu a ligaci upravené RNA molekuly.

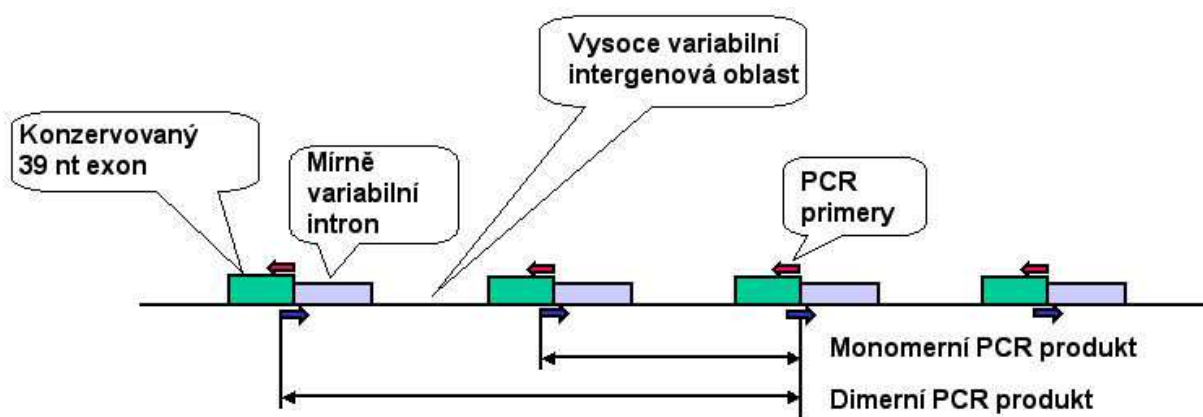
Počet chromozomů je velký, ale mění se s ohledem na druh, poddruh a dokonce mezi kmeny jednoho druhu. Navíc během mitosy nedochází ke kondenzaci chromozomů (Vickerman, 1994). S ohledem k jejich medicínskému významu byl u třech druhů trypanosomatid (*T. cruzi*, *T. brucei* a *L. major*) osekvenován celý genom (El-Sayed a kol., 2005). Bylo zjištěno, že tyto genomy obsahují přibližně 8 až 12 tisíc protein-kódujících sekvencí a geny jsou takřka prosty intronů (El-Sayed a kol., 2005). Také bylo prokázáno, že jednotlivé geny jsou uspořádány za sebou ve skupinách (Berriman a kol., 2005; Ivens a kol., 2005). Pozoruhodné je též uchování pořadí genů (syntenie) v rámci trypanosomatid u protein-kódujících genů (El-Sayed a kol., 2005). Většina spolu sousedících protein-kódujících genů

nemá stejnou funkci, přesto jsou transkribovány společně do jedné mRNA, čímž se odlišují od funkce operonů u bakterií nebo nematod (Campbell a kol., 2003). Vzniklá polycistronická mRNA je dále rozštipána na jednogenové úseky při trans-sestřihu (trans-splicing).

**Trans-splicing** byl objeven u kinetoplastid, ale následně byl popsán u nematodů, některých trematod a euglenidů (shrnul Nilsen, 2001). Během procesu trans-splicingu dochází k maturaci mRNA, která tak obdrží 7-metylguanosinovou čepičku a poly-A konec při spřažených reakcích (LeBowitz a kol., 1993 cit. dle Campbell, 2003). Tyto molekuly jsou zpravidla velmi dlouhé a obsahují několik otevřených čtecích rámců, proto je 5' konec těžké definovat. Molekuly s tímto heterogenním počátkem jsou efektivně sestřihnuty a opatřeny čepičkou přidáním 39 nukleotidů dlouhé sekvence SL (Agabian, 1990). Důsledkem trans-splicingu je opravení čtecích rámců a RNA je tak připravena k translaci. Jako při procesu cis-sestřihu dochází i u trans-sestřihu ke dvěma transesterifikačním reakcím, které ovšem nezahrnují vznik meziprojektu ve tvaru lasa (lariat), ale strukturu připomínající Y. Pro tento proces jsou potřebné dinukleotid AG na 3' sestřihovaném konci a před ním (upstream) umístěná oblast bohatá na pyrimidinové báze (Martínez-Calvillo a kol., 2010). K těmto reakcím jsou také zapotřebí U snRNP (Mottram a kol., 1989).

Molekula „**spliced-leader**“ (SL), též nazývaná mini-exon, je krátká konzervovaná sekvence, která je kódovaná rodinou genů s vysokým počtem kopií na jeden genom. V rámci kinetoplastid je SL konzervovaná v daném genomu, ale mezi druhy se liší velikostí i sekvencí (Campbell a kol., 2003). Počáteční sekvence (5'-AACU-3') je vysoce konzervovaná mezi jednotlivými druhy trypanosomatid. Pravděpodobně tak přispívá k substrátové specifitě enzymů syntetizujících čepičku (Mair a kol., 2000). Molekula SL RNA je rozdělena na několik částí. Nejdříve je vedoucí sekvence (SL) dlouhá 39-41 nukleotidů, následovaná intronem o proměnlivé délce. Dále následuje oblast několika thymidinů (5-31) tzv. T-trakt, který se zřejmě uplatňuje při terminaci transkripce (Sturm a kol., 1999). Celá molekula zaujímá sekundární strukturu s třemi smyčkami. Mezi druhou a třetí smyčkou je umístěno Sm-vazebné místo, k němuž se váží jaderné proteiny SL ribonukleoproteinové částice (SL RNP) a které je obdobou pro Sm-vazebné místo snRNA (Bruzik a kol., 1988; Mandelboim a kol., 2002).

V genomu trypanosomatid se geny pro SL RNA vyskytují v poměrně vysokém počtu kopií (přibližně 200 na haploidní genom) a jsou uspořádány v tandemu (Matkin a kol., 2001). Gen pro SL RNA obsahuje konzervativní oblast exonu následovanou mírně variabilním intronem. Mezi jednotlivými geny pro SL RNA se nachází vysoce variabilní intergenová oblast (obr. 2.1). Při amplifikaci genu SL RNA často dochází k získání nejen monomerních produktů, ale někdy mohou být přítomny i dimery.



Obr. 2.1 Struktura genu *SL RNA* a amplifikační schéma (upraveno dle Murthy a kol., 1992)

Pozoruhodná je skutečnost, že u některých druhů trypanosomatid nalezneme v cytoplasmě **endosymbiotickou bakterii**. Tato bakterie je lokalizována v blízkosti jádra hostitelského organismu. Během buněčného dělení prvoka získá každá dceřiná buňka svůj endosymbiotický mikroorganismus, což naznačuje, že buněčné cykly prvoka a bakterie jsou synchronizované (de Souza a Motta, 1999). Pokud se při kultivaci těchto prvoků použijí antibiotika, endosymbiont vymizí a v kultuře zůstanou pouze aposymbiotičtí jedinci (de Souza a Motta, 1999). Význam těchto bakterií spočívá v tom, že jsou schopny nahradit chybějící metabolické procesy a dokáží syntetizovat esenciální látky. U trypanosomatid chybí kompletní dráha pro syntézu hemu, tento nedostatek tak kompenzují enzymy bakterie (Chang a kol., 1975). Přítomnost endosymbiotického organismu se také projevuje na morfologii buňky bičíkovce. Dochází k reorganizaci kinetoplastové DNA a také ke ztrátě paraflagelární tyče bičíku (Freymüller a Camargo, 1981). Paraflagelární tyč je struktura pomocí níž dochází k interakcím mezi parazitem a hostitelem (Tetley a Vickerman, 1985 cit. dle Gadelha a kol., 2005). Postrádající tuto strukturu jsou přesto i tito bičíkovci schopni interagovat s hostitelskými buňkami, a to dokonce lépe než od nich odvozené aposymbiotické kmeny (Fampa a kol., 2003). V pozdější studii u druhu *Crithidia deanei*, u kterého se také nachází endosymbiont, se prokázala přítomnost kryptické paraflagelární tyče (Gadelha a kol., 2005).

Endosymbiotická trypanosomatida tvoří na fylogenetických stromech vytvořených na základě sekvencí pro 18S rRNA samostatnou monofyletickou skupinu (Du a kol., 1994b; Hollar a kol., 1998; Maslov a kol., 2001). Toto zjištění nasvědčuje skutečnosti, že tyto organismy získaly endosymbionta pouze jednou během evoluce. Fylogenetická pozice endosymbiontů byla odvozena z jejich sekvence pro 16S rRNA (Du a kol., 1994a). Zjistilo se, že tyto organismy jsou si vzájemně blízce příbuzné a na fylogenetickém stromě je nalezneme v blízkosti bakterie *Bordetella bronchiseptica* ze skupiny  $\beta$ -proteobakterií (Du a kol., 1994a).

Ovšem nedávné fylogenetické studie založené na sekvencích proteinů umístily tyto bakterie mezi  $\gamma$ -proteobakterie blízkce příbuzných rodu *Pseudomonas* (Motta a kol., 2004). Osekvenování genomu endosymbionta z trypanosomatida *Crithidia deanei* opět významně podpořilo klasifikaci mezi  $\beta$ -proteobakterie (Umaki a kol. 2009 cit. dle Kořený a kol., 2010).

V buňkách trypanosomatid nalezneme neobvyklé organely. Jednou z nich je **glykosom**, který se spolu s mitochondrií uplatňuje v energetickém metabolismu. Glykosomy jsou specifické peroxisomy, které hrají centrální roli v metabolismu buňky (shrnuła Hannaert a kol., 2003). V této organelle se nacházejí enzymy několika katabolických a anabolických cest. Hlavní část enzymů glykolýzy jsou umístěny právě v této organelle. Dále se zde nachází kataláza uplatňující se v metabolismu peroxidu, enzymy  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a první část biosyntézy etherových lipidů, HMG-CoA reduktáza důležitá při syntéze isoprenoidů. Glykosomy také obsahují enzymy pentózofosfátového cyklu. Unikátní je přítomnost enzymů glukoneogeneze, biosyntézy pyrimidinů a zužitkování purinů.

Další atypickou organelou je **acidokalcisom** patřící mezi buněčné struktury, které zůstaly během evoluce konzervovány od prokaryot k eukaryotickým organismům. Poprvé byly popsány právě u trypanosomatid (Vercesi a kol., 1994). Acidokalcisomy jsou elektron-densní tělíška s vysokou koncentrací fosforu přítomného ve formě pyrofosfátu nebo polyfosfátu v komplexu s vápníkem nebo dalšími prvky (hořčík, sodík, draslík, zinek, železo). Můžou zde být uskladněny i bazické aminokyseliny. Většina těchto složek je uskladněna v milimolárních nebo molárních koncentracích. Funkce acidokalcisomů spočívá v uskladnění kationtů, metabolismu polyfosfátů, homeostázi vápníku, udržení vnitrobuněčné pH homeostáze a osmoregulaci (Docampo a kol., 2005).

### 2.3 Morfologická stádia

Trypanosomatida se v průběhu svého životního cyklu mění a prodělávají morfologické změny. Podle polohy kinetoplastu vzhledem k jádru, průběhu bičíku, tvaru flagelární kapsy a celkového vzhledu buňky rozeznáváme několik morfologických stádií: amastigotní, promastigotní, choanomastigotní, endomastigotní, paramastigotní, opisthomastigotní, epimastigotní a trypomastigotní (Hoare a Wallace, 1966). Kulovitým tvarem je charakterizováno **amastigotní** stádium. Bičík je velice krátký a jen nepatrně vystupuje z flagelární kapsy. V některých případech mohou amastigoti tvořit flagelární cysty nebo-li pseudocysty, u kterých se však nevytváří pravá cystová stěna. Prodloužená buňka je typická pro **promastigota**, bičík u této formy vybíhá vpřed z flagelární kapsy a tvoří tak funkční organelu. Před jádrem, blízko k anteriornímu konci buňky, je umístěn kinetosom

a kinetoplast. Svým vzhledem připomíná **choanomastigot** ječné zrnko, bičík vystupuje z široké jakoby trychtýřkovité kapsy. Velký kinetoplast se nachází laterálně k jádru. **Endomastigotní** stádium je charakterizováno svinutou flagelární kapsou, báze bičíku a kinetoplast ustupují do buňky okolo jádra a stáčí se okolo něj. Samotný bičík nevystupuje z buňky. **Paramastigot** je přechodná forma mezi promastigotním a opisthomastigotním stádiem. U tohoto morfotypu se kinetoplast a kinetosom nachází vedle jádra. Pokud jsou kinetoplast a kinetosom lokalizovány u posteriorního konce za jádrem, jedná se o **opisthomastigota**. Celou buňkou tak prochází dlouhá flagelární kapsa, která ústí na anteriorním konci. Tvorba undulující membrány je typická pro dva morfotypy – epimastigota a trypomastigota. **Epimastigotní** morfa má kinetoplast s kinetosomem lokalizovány mezi předním koncem buňky a jádrem, krátká undulující membrána je vytvořena na proximálním úseku bičíku. Naopak u **trypomastigota** je undulující membrána zformována po celé délce buňky. Kinetoplast s kinetosomem se nalézá u posteriorního konce stejně jako je tomu u opisthomastigota (Vickerman, 2000; Roberts & Janovy, 2005).

Většina výše uvedených morfotypů se může objevit ve dvou rozdílných stavech. Na jedné straně to jsou volně pohyblivé buňky parazita, které se označují jako nektomonády. Na straně druhé to jsou haptomonády přichycené pomocí bičíků ke stěně střeva.

Všechna uvedená morfologická stádia jsou popsána u jednohostitelských trypanosomatid. Dříve se tato stádia též mohla označovat podle rodu, u kterého se nejčastěji vyskytovala: např. leishmaniové stádium pro amastigota, crithidiové stádium pro epimastigota, leptomonádové pro promastigota. Ovšem situace je komplikována faktem, že u některých rodů můžeme nalézt více morfotypů. Amastigotní stádia nalezneme u rodů *Leptomonas* a *Rhynchoidomas*. Někteří zástupci z rodů *Leptomonas* a *Blastocrithidia* tvoří amastigotům podobné pseudocysty. Také je známá tvorba flagelárních cyst, tzv. „straphangerů“. Pro rod *Blastocrithidia* jsou charakteristická epimastigotní stádia, avšak ty jsou pozorována i u rodů *Crithidia* a *Rhynchoidomonas*. Rod *Crithidia* je ovšem typický tvorbou choanomastigotů a rod *Rhynchoidomonas* trypanomastigotů. Promastigotní stádia jsou příznačná pro rody *Leptomonas* a *Sergeia*, ale během svého životního cyklu je tvoří i *Herpetomonas* a *Wallaceina*. U rodu *Wallaceina* je typická endomastigotní forma. Morfy opisthomastigota a paramastigota jsou popsány pouze u rodu *Herpetomonas* (Vickerman, 2000; Svobodová, 2007).

## 2.4 Klasická taxonomie a její problematika

V 70. letech minulého století vznikla klasická taxonomie trypanosomatid založená na tvaru a velikosti buňky a vzájemné pozice kinetoplastu s jádrem (Hoare a Wallace, 1966). V současnosti se však ukazuje, že tento systém založený na morfotypech je nedostatečný a značně omezený. Jednotlivé morfologické typy jsou sdíleny více rody a jeden druh může ve svém životním cyklu vytvořit několik forem. Značnou morfologickou variabilitu lze demonstrovat např. na druhu *Herpetomonas trimorpha*, jehož životní cyklus zahrnuje malé promastigoty, mikroflagelátní a dlouhé promastigoty (Zídková a kol., 2010). Jednotlivé morfologické typy mohou být značně modifikovány vlivem environmentálních podmínek nebo při zavedení do kultury (Podlipaev, 2000; Momen, 2001; Yurchenko a kol., 2006a; Svobodová a kol., 2007). Determinace do druhů by tedy neměla být omezena nepřítomností některých morfologických forem, např. u druhu *H. ziplika* nebyly pozorovány opisthomastigotní formy, které jsou pro tento rod typické (Podlipaev a kol., 2004b). Z tohoto důvodu byl navržen nový systém, založený na jiných vlastnostech těchto parazitů jako jsou rozdíly v biochemii, příjmu potravy a ultrastruktury (Wallace a kol., 1983). Jednotlivé izoláty se mohou lišit v nutričních požadavcích na složení kultivačního média, využití sacharidů, využití aminokyselin, exkrečních produktech, přítomností nebo absencí enzymů, povrchovými proteiny, elektroforetickou mobilitou isoenzymů ad. (Yoshida a Camargo, 1978; Gonçalves de Lima a kol., 1982; Camargo a kol., 1982; Wallace a kol., 1983). V nedávné době byly použity další postupy k rozlišení jednotlivých druhů. Abreu-Filho a kol. (2001) navrhli determinaci jednotlivých izolátů rodu *Phytomonas* dle skladby membránových komponent. Také se prokázalo, že atypické organely acidokalcisomy, respektive jejich počet a složení prvků v nich, jsou druhově specifické (Miranda a kol., 2004). Dalším determinačním znakem může být profil proteolytických enzymů u trypanosomatid (Santos a kol., 2005). Objevení všech těchto metod je jistě velmi užitečné při popisu jednotlivých druhů trypanosomatid a v současnosti jsou u mnohých popisů využívány i jejich kombinace, ovšem tyto charakteristiky jsou takřka nepoužitelné při zařazení druhů/izolátů do vyšší taxonomické jednotky – rodu.

S vývojem molekulárně-biologických studií stále více vycházelo najevo, že existující taxonomie kinetoplastid neodráží skutečné příbuzenské vztahy mezi těmito organismy a bude tak třeba využití molekulárně-fylogenetických metod (McGhee a Cosgrove, 1980; Vickerman, 1994; Hollar a kol., 1998; Maslov a kol., 2001, Yurchenko a kol., 2006a). Tyto metody jsou obecněji využitelné a mají těž vyšší schopnost přiřazení nových izolátů do rodů. Při konstrukci fylogenetických stromů se využívá několik molekulárních znaků (markerů). Jsou

to sekvence pro geny RNA molekul pro malou ribozomální podjednotku (18S rRNA), 5S rRNA, spliced-leader (SL RNA), ale i protein-kódující geny pro glykosomální glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (gGAPDH), cytosolické proteiny teplotního šoku (cHSP70, cHSP90) a velkou podjednotku RNA polymerázy II (RPOIILS) (Hollar a kol., 1998; Merzlyak a kol., 2001; Simpson a kol., 2002; Podlipaev a kol., 2004a; Simpson a kol., 2004; Westenberger a kol., 2004; Yurchenko a kol., 2006a, b; Svobodová a kol., 2007; Yurchenko a kol., 2008; Yurchenko a kol., 2009; Votýpka a kol., 2010). Molekulárně-fylogenetické analýzy prokázaly nevhodnost existujícího systému klasifikace rodů. Na nově vytvořených fylogenetických stromech založených na různých genech je patrný vznik několika monofyletických a statisticky velmi dobře podpořených skupin, které mohou být v budoucnosti označeny za nové rody.

Sekvence pro SSU rRNA a některé geny kódující proteiny nejsou vhodné pro odlišení blízce příbuzných druhů, a to z důvodu jejich pomalé sekvenční divergence. Naopak příhodné je jejich využití při sledování evoluce v dlouhém časovém měřítku. Pomocí těchto sekvencí můžeme rozlišit jednotlivé rody nebo skupinu blízce příbuzných druhů. K rozpoznání blízce příbuzných organismů je vhodné použít sekvence pro SL RNA (Podlipaev a kol., 2004a; Westenberger a kol., 2004). Sekvence tohoto genu resp. celého lokusu se nechá využít hned několika způsoby. Geny pro SL RNA jsou uspořádány v tandemu a jsou v buňce přítomny v relativně vysokém počtu kopií (přibližně 200 kopií na haploidní genom) (Matkin a kol., 2001) a představují jeden z nejužitečnějších molekulárních markerů pro genotypizaci trypanosomatid (Murthy a kol., 1992). Konzervovaná sekvence exonu umožňuje specifickou (gen SL je přítomen pouze u trypanosomatid) a účinnou amplifikaci z širokého spektra druhů. Pro selektivní seskupení příbuzných druhů je vhodnější mírně variabilní intron. Nejjemnější oddělení na úrovni populací umožňuje vysoce variabilní intergenová oblast. Variabilita intergenové oblasti není jen sekvenční, ale ovlivňuje i celkovou délku výsledného amplikonu, z toho plyne možnost přímého využití při odlišení jednotlivých druhů (Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010). Navíc SL není v hmyzím hostiteli nebo v obratlovcích přítomen, tudíž se nabízí možnost amplifikace tohoto genu z environmentálních vzorků, např. v případě neúspěšné kultivace nebo při snaze o odhalení směsných infekcí (Westenberger a kol., 2004; Yurchenko a kol., 2009). V některých případech může být v intergenové oblasti přítomen gen pro 5S rRNA (Westenberger a kol., 2004).

Cílem práce od Westenberger a kol. (2004) bylo kromě jiného prozkoumání celkového potenciálu genu SL RNA pro genotypizaci včetně identifikace nových druhů nebo vyšších taxonomických jednotek. Pozice 1-20 exonu obsahuje sekvenci nukleotidů, které mohou



sloužit jako diagnostický znak pro jisté druhy a umožňují předběžné seskupení nově získaných sekvencí. Přesnou genotypizaci těchto předběžných skupin zajistí celá sekvence genu. Pro co nejpřesnější fylogenetické analýzy (nezatížené chybou sekvencí vysoce variabilní intergenové oblasti) je vhodné použít část sekvence od pozice –100 ke konci intronu (ohraňován oblastí T-traktu). Samostatné typové jednotky (TU), které byly vyčleněny na základě molekulárně-fylogenetických analýz tohoto úseku SL, mohou mít potenciál nového druhu (Westenberger a kol., 2004; Yurchenko a kol., 2006a, b; Votýpka a kol., 2010). Jako hraniční hodnota pro variaci mezi druhy bylo zvoleno 90% podobnost sekvence (Westenberger a kol., 2004)<sup>1</sup>. Použitím této metody na trypanosomatida zmizela překážka v podobě problematického rozlišení velmi příbuzných druhů, což dosud omezovalo výzkum diverzity, distribuce a hostitelské specifity.

Na případu nového druhu *Blastocrithidia largi* se ukázalo, že bude potřeba zavést nový koncept pro „molekulární“ druh. Vzájemná podobnost s druhem *B. triatomae* je podle sekvence SSU rRNA 99,5 % zatímco podle sekvence pro SL RNA pouze 69,9 % podobnosti. Vzhledem k tomu, že některé izoláty (potažmo druhy) jsou nekultivovatelné, nebude možné vždy získat buňky pro morfologické popisy. Navíc jak se již prokázalo, morfologické popisy jsou často zavádějící nebo neinformativní, zvláště na druhové úrovni. Pouhé zavedení hranice podobnosti sekvence však nebude dostatečné (pro sekvenci SL 90 %). Místo toho bude potřeba zavést kombinaci genomických dat s ekologickými, morfologickými a fyziologickými údaji, na základě kterých se odliší jednotlivé druhy (Maslov a kol., 2010).

Fylogenetický strom může být také využit jako základ pro studium vzniku a evoluce parazitismu, stejně tak jako unikátních molekulárních a biochemických mechanismů, které jsou popsány u těchto organismů. Vznik parazitismu mezi kinetoplastidy není ojedinělá událost a odehrála se několikrát (Simpson a kol., 2006). Fylogenetické stromy též ukazují, že opakovaně došlo i ke vzniku vícehostitelských cyklů mezi trypanosomatidy (Simpson a kol., 2006). Z fylogenetických analýz můžeme vysledovat např. evoluci RNA editingu v mitochondrii trypanosomatid (Simpson a kol., 2000) nebo nově byla navržena evoluce syntézy hemu u kinetoplastid (Kořený a kol., 2010).

### **Topologie fylogenetického stromu trypanosomatid dle sekvencí SSU rRNA**

Výsledkem molekulárně-fylogenetických analýz bylo zjištění, že některé rody jsou polyfyletické (Hollar a kol., 1998; Merzlyak a kol., 2001; Svobodová a kol., 2007; Yurchenko a kol., 2008). Na druhé straně vzniklo také několik dobře statisticky podpořených

---

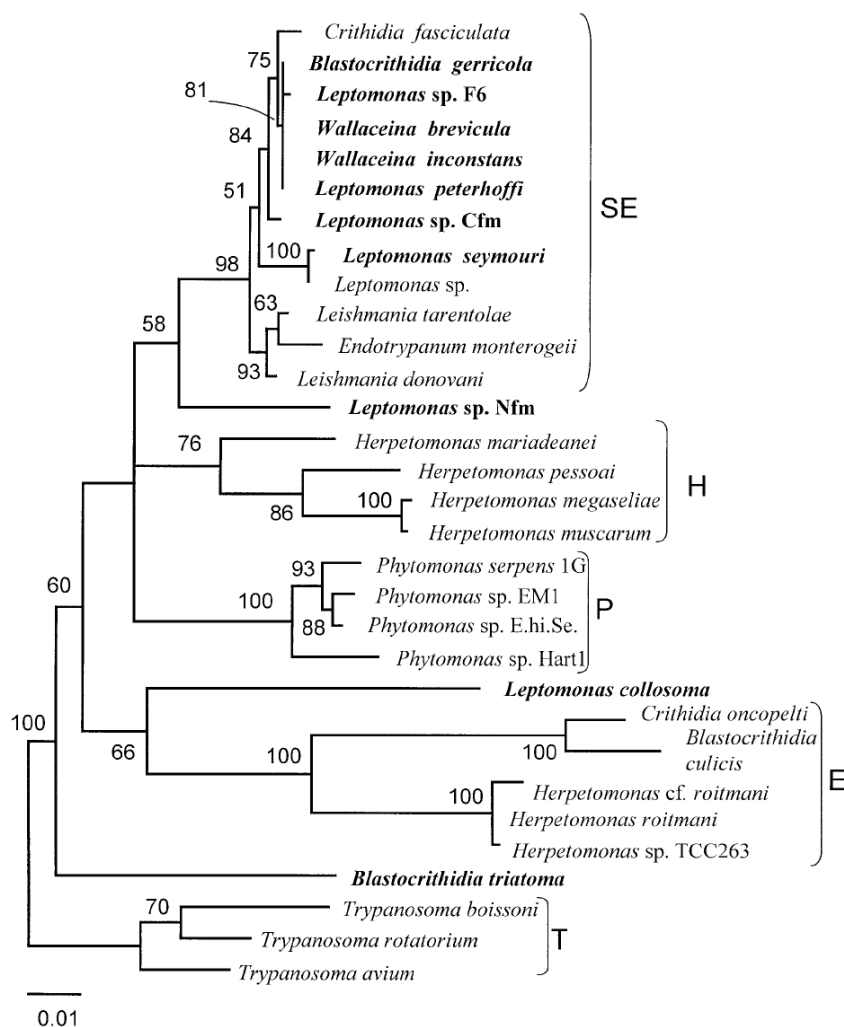
<sup>1</sup> Variabilita do 10 % je považována za variabilitu vnitrodruhovou.

monofyletických skupin, ze kterých by mohly být v budoucnosti ustanoveny nové rody. Prvním takovým rodem byl rod *Sergeia* (Svobodová a kol., 2007). Na fylogenetických stromech jsou patrné dvě skupiny – organismy na bázi stromu patřící do rodu *Trypanosoma* (označované “T”) a ostatní trypanosomatida (“NT” – non-trypanosome), které se dále rozdělují na čtyři samostatné monofyletické větve (Merzlyak a kol., 2001). V roce 1997 bylo prokázáno, že rod *Trypanosoma* je monofyletický (Lukeš a kol., 1997). Od té doby bylo publikováno několik prací, které tuto teorii potvrzují (např. Hannaert a kol., 1998), ovšem existují i názory zpochybňující monofylii a tvrdící, že trypanosomy jsou parafyletické (Hughes a Piotkivska, 2003a, b). S dalšími studii byla znovu potvrzena monofylie rodu (Simpson a kol., 2004; Hamilton a kol., 2004) a prozatím byl tento spor uzavřen.

U kořene stromu trypanosomatid je ve většině studií umístěn druh *Blastocrithidia triatoma*. Tato skutečnost je velmi zajímavá a naznačuje možnost vzniku trypanosomatid ze společného předchůdce podobného epimastigotní buňce (Merzlyak a kol., 2001). Toto zjištění není v rozporu s hypotézami, které byly vyřčeny již dříve. V posledních letech se navíc objevilo mnoho příbuzných typových jednotek k druhu *B. triatoma* a spolu vytvořily samostatnou, statisticky dobře podpořenou linii “B” (Maslov a kol., 2007; Yurchenko a kol., 2009; Votýpka a kol., 2010). Jedna typová jednotka byla nově popsána jako druh *B. largi* (Maslov a kol., 2010).

Pomocí fylogenetických analýz bylo odhaleno, že čtyři rody – *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas* a *Leptomonas* – jsou polyfyletické (Hollar a kol., 1998; Merzlyak a kol., 2001; Svobodová a kol., 2007; Yurchenko a kol., 2008). Jednotlivé zástupce těchto rodů nalezneme roztroušené po celém stromě. Výjimkou jsou některé druhy, u kterých nalezneme v cytoplasmě endosymbiotickou bakterii (např. *Crithidia oncopelti*, *Blastocrithidia culicis* a *Herpetomonas roitmani*), a které vytvořily samostatnou jednotku (“E” – endosymbiont) (Du a kol., 1994b; Merzlyak a kol., 2001). Oddělení těchto organismů v podobě samostatné větve jasně demonstruje, že typ morfologického stádia není vhodným měřítkem pro determinaci rodu a určení příbuznosti mezi těmito prvky.

Další monofyletickou skupinou je rod *Phytomonas* (“P”) (Hollar a Maslov, 1997; Merzlyak a kol., 2001) a společně s rodem *Trypanosoma* jsou tak příkladem ojedinělé shody mezi fylogenezí a taxonomií založené na morfologii. S velkou statistickou podporou vznikla větev “H” zahrnující některé druhy herpetomonád (*H. muscarum*, *H. megaseliae*, *H. ztiplika*, ad.) (Merzlyak a kol., 2001; Podlpaev a kol., 2004a, b). K této skupině trypanosomatid se však přiřadily i druhy *Leptomonas lactosovorans*, *Leptomonas* sp. Nfm a trypanosomatid „X” (Podlpaev a kol., 2004a; Yurchenko a kol., 2006b), následkem čehož tato skupina nesdílí jeden společný morfotyp, a kromě opisthomastigotů zde nalezneme také promastigoty (*Leptomonas*, *H. ztiplika*).



Obr. 2.2 Topologie fylogenetického stromu čeledi Trypanosomatidae dle sekvencí genu SSU rRNA vytvořeného metodou ML (převzato z Merzlyak a kol., 2001).

Korunu fylogenetického stromu tvoří seskupení nazývané “SE“ (slowly-evolving). Toto označení odráží relativně pomalou rychlost divergence sekvence genu pro malou ribozomální podjednotku (Hollar a kol., 1998; Merzlyak a kol., 2001). V rámci “SE“ skupiny vzniklo několik dalších samostatných podskupin (Yurchenko a kol., 2006a, b; 2008; 2009). Mezi nimi nalezneme jak monoxenní rody, tak i dixenní rod *Leishmania*. Tento rod je tvořen samostatnou větví (“LE“) se sesterskou skupinou tvořenou druhy *Leptomonas costaricensis* a s dosud blíže neidentifikovaným izolátem G755 objeveného v guatemalském flebotomovi (Noyes a kol., 1997; Yurchenko a kol., 2006b). Recentně (Maslov a kol., 2010) byl popsán další jednohostitelský druh (*L. barvae*), který je také sesterským k leishmaniím.

Jednohostitelští zástupci větve “SE“ se zformovali do několika monofyletických větví. Linie “C“ zahrnuje některé organismy z rodu *Crithidia* a jeden druh *Leptomonas* sp. P s buňkami podobajícími se choanomastigotům. V jejich blízkosti se objevila trypanosomatida, u kterých byla pozorována promastigotní forma. Na základě této skutečnosti byla předběžně přiřazena k rodu *Leptomonas* (druhy *L. acus*, *L. bifurcata*, *L. tarcoles*), i když zůstává otevřena otázka, zda by neměly tyto leptomonády vytvořit nový rod nebo se seskupit společně s jejich nejbližšími příbuznými crithidiemi (Yurchenko a kol., 2008). Větev “NR“ představuje několik geograficky vázaných druhů, které jsou charakterizovány dle morfologie jako představitelé tří rozdílných rodů. Avšak podle molekulárních analýz jsou si velmi blízké mezi sebou a s druhem *Wallaceina brevicula*. Linii “L2“ představují druhy rodu *Leptomonas* (Yurchenko a kol., 2008, 2009).

Na fylogenetickém stromě vytvořeném dle sekvencí gGAPDH je také patrné vytvoření několika linií. Statisticky velmi dobře podpořené linie jsou tvořeny rodem *Trypanosoma*, *Phytomonas* a skupinou “SE“. Na rozdíl od stromu SSU se linie tvořená herpetomonádami rozpadla do tří parafyletických linií, podobný jev můžeme pozorovat u skupiny trypanosomatid obsahující endosymbionty (“E“). Linie tvořená druhem *Blastocrithidia triatoma* zde není zastoupena, dosud totiž nebyla získána sekvence pro gGAPDH (Zídková a kol., 2010). Také na fylogenetickém stromě zkonstruovaném dle sekvencí genu SL RNA je patrné vytvoření několika skupin. Je zde větev tvořená popsány i nepopsány druhy trypanosomatid náležících k rodu *Blastocrithidia*. Samostatné větve vytváří i rod *Leishmania* a *Phytomonas* a na bázi stromu je linie tvořená rodem *Trypanosoma* (Votýpka a kol., 2010).

Shrňme-li všechna fakta, je skupina pomalu se vyvíjejících trypanosomatid značně různorodá. Nalezneme zde široké spektrum morfotypů – promastigoty, choanomastigoty, endomastigoty a amastigoty. Korelace mezi morfologií a fylogenezí je takřka nepozorovatelná. Blízce příbuzné druhy se liší morfologicky a naopak fylogeneticky vzdálené organismy vykazují podobnou morfologii. Tato skutečnost svědčí o proběhlé konvergentní a regresní evoluci (Yurchenko a kol., 2009).

## **2.5 Ploštice (Heteroptera) jako hostitelé monoxenních trypanosomatid**

Trypanosomatida jsou velmi rozšířenou skupinou parazitů a nalezneme je u širokého spektra hostitelů. Snad jen o parazitických hlísticích (Nematoda) se dá prohlásit, že jsou v tomto aspektu úspěšnější (Vickerman, 1994). Jednohostitelská trypanosomatida se nejčastěji vyskytují u hmyzu. Další sporadické nálezy byly zjištěny u nálevníků, nematod a klíšťat (Podlipaev, 1990). Jako hostitelské prostředí mohou být využívány i rostliny, resp. jejich

plody a semena (Jankevicius a kol., 1993; Fiorini a kol., 2001; Marín a kol., 2007). Vskutku pozoruhodná je schopnost těchto hmyzích parazitů infikovat imunodeficientní pacienty a vyvolat u nich symptomy podobné leishmanióze (shrnul Chicharro a Alvar, 2002). Mezi nejnovější popsané případy patří nákaza HIV pozitivního člověka bičíkovcem, který je blízce příbuzný druhu *Herpetomonas samuelpe-soai* (Morio a kol., 2008).

Podlipaev (2000, 2001) odhaduje, že z milionu dosud známých druhů hmyzu, bylo prozkoumáno na přítomnost těchto bičíkovců pouze 2 až 2,5 tisíce druhů. Do 80. let minulého století bylo popsáno zhruba 350 druhů jednohostitelských trypanosomatid (Wallace a kol., 1983). V průběhu dalších 20 let přibylo na 200 nových popisů, avšak pouze z omezeného počtu lokalit (Podlipaev, 2001). Největší výskyt jednohostitelských trypanosomatid byl zaznamenán u řádů dvoukřídých (Diptera) a ploštic (Heteroptera), což činí 55 % a 35 % ze všech popisů (Wallace, 1966). Opomíjené jsou v tomto směru blechy (Siphonaptera), i když nedávno zjištěná prevalence je i u nich značná. U ptačích blech dosahovala prevalence 16 % (Duží, 2007) a u savčích druhů 15 % (Suková, 2009).

V současnosti patří k nejstudovanějším skupinám trypanosomatida heteropterního hmyzu. Existuje odhad, že na nákazu jednohostitelskými trypanosomatidy bylo vyšetřeno pouhých 500 až 600 druhů ploštic z celkového počtu 23 tisíc existujících druhů. Ve 150 různých druzích byli tito jednobuněční paraziti zjištěni, což činí 25 až 30% prevalenci (Teixeira a kol., 2000). Podle těchto údajů se může očekávat objevení až 6 000 hostitelských druhů ploštic.

Monoxenní trypanosomatida z rodů *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* a *Wallaceina* byla popsána u plošticích druhů z těchto čeledí heteropter: Alydidae, Belostomatidae, Coreidae, Geocoridae, Gerridae, Largidae, Lygaeidae, Miridae, Nabidae, Nepidae, Pentatomidae, Pyrrhocoridae, Reduviidae, Rhopalidae, Rhyparochromidae, Saldidae a Veliidae (Wallace, 1966; Podlipaev, 1990; Kostygov a kol., 2004; Westenberger a kol., 2004; Yurchenko a kol., 2006a; Votýpka a kol., 2010). Což činí zlomek z celkového počtu 88 čeledí ploštic (Schuh a Slater, 1995; Hebsgaard a kol., 2004; Damgaard, 2008; Grazia a kol., 2008; Schuh a kol., 2009). Do roku 1990 bylo popsáno z ploštic celkem 74 druhů jednohostitelských trypanosomatid: 24 druhů rodu *Blastocrithidia*, 16 rodu *Crithidia*, 32 rodu *Leptomonas* a 2 rodu *Wallaceina* (Podlipaev, 1990). Často se jedná o zastaralé popisy a existuje možnost, že některé z nich mohou být synonymní. Také je nutné zmínit, že v literatuře se objevuje mnoho blízce neurčených nálezů přiřazených pouze k jednotlivým rodům. Mnoho izolátů bylo studováno pouze pomocí světelné mikroskopie a jejich příbuzenský vztah k ostatním organismům zůstává nejasný. V plošticích byly sporadicky

nalezeny i druhy rodu *Herpetomonas*. Vzhledem k tomu, že se jednalo o dravé druhy ploštic, je tu možnost nákazy získané z ulovené potravy (Carvalho a Deane, 1974; Podlipaev, 1990). V současné době došlo k několika popisům nových druhů izolovaných z ploštic (Yurchenko a kol., 2008, 2009; Maslov a kol., 2010).

Nejen jednohostitelská trypanosomatida parazitují v heteropterním hmyzu. Ten také může sloužit jako hostitel dixenních rodů *Trypanosoma* a *Phytomonas*. Ploštice z čeledi Reduviidae jsou přenašeči významného patogena člověka – *T. cruzi*, původce Chagasovy choroby. Kromě tohoto druhu u nich nalezneme *T. conorhini* a *T. rangeli*.

Na diverzitu jednohostitelských trypanosomatid u ploštic bylo zaměřeno několik současných studií (viz dále). K relativně dobře prostudovaným oblastem patří regiony ve Střední a Jižní Americe. Především se jedná o území Kostariky a Ekvádoru (studie od Westenbergera, Lukeše, Yurchenka, Maslova ad.) a Brazílie (studie od Camarga, Batistoti ad.). V Evropě se k probádaným územím řadí bývalý Sovětský svaz (studie Podlipaeva, Kostygova, Frolova ad.) a oblasti ve střední Evropě (Votýpka, Svobodová, Zídková). Další poznatky o diverzitě jednohostitelských trypanosomatid v České republice by měla přinést tato práce. Afrika, Austrálie, Japonsko a Jihovýchodní Asie (kromě Číny) představují dosud takřka neprobádaná území (Podlipaev, 2000; Votýpka a kol., 2010). V současné době se vyhodnocují údaje o izolátech získaných v Ghaně a na Madagaskaru (Votýpka a Lukeš, nepublikovaná data).

Přítomnost a diverzitu jednohostitelských trypanosomatid v subarktickém regionu prověřila studie od Kostygova a kol. (2004). Během ní se i v takto vysokých zeměpisných šířkách odhalila poměrně značná rozmanitost fauny trypanosomatid. Shluková analýza izolátů získaných ze severozápadu a severu Ruska ukázala, že téměř každý izolát reprezentuje samostatnou typovou jednotku s různou mírou vzájemné příbuznosti. Jednotlivé kmeny byly charakterizovány metodou UP-PCR (universally primed PCR), což je rychlá a věrohodná metoda genotypizace s jejíž pomocí byla odhalena diverzita a jedinečnost jednotlivých izolátů. V souladu s touto metodou jsou i fylogenetické analýzy, do nichž byly zahrnuty i druhy trypanosomatid popsané na území severního Ruska v průběhu předchozích 20ti let z různých čeledí ploštic (Gerridae, Miridae, Nabidae, Saldidae) a dvoukřídlých (Merzlyak a kol., 2001; Podlipaev a kol., 2004a). Z analýz vyplynulo, že většina těchto druhů tvoří samostatnou linii umístěnou v koruně fylogenetického stromu v rámci “SE“ větve. Vzhledem ke svému geografickému původu patří tyto druhy trypanosomatid k postglaciální fauně (Podlipaev, 2001). Ta do těchto míst invadovala ne dříve než před 15ti tisíci lety (Nikonov a Shlyukov, 2002 cit. dle Podlipaev a kol., 2004a). Tato doba může být krátká na vznik

detekovatelných genetických změn, avšak ne změn morfologických. Dle morfologie byly jednotlivé izoláty (*Leptomonas* sp. F6, F5, *Blastocrithidia gerricola* KV1 a *B. miridarum* MB4) přiřazeny do rozdílných rodů, ale na fylogenetickém stromě si jsou vzájemně velmi blízké a tvoří samostatnou skupinu (Merzlyak a kol., 2001; Podlipaev a kol., 2004a). Možná však u těchto druhů došlo k záměně dvou různých organismů. V plošticí byl pravděpodobně přítomný jiný druh trypanosomatida, který byl popsán na základě morfologie, avšak sekvence pocházejí z druhu, který se objevil v kultuře. Všechny tyto druhy jsou blízce příbuzné wallaceinám.

V Brazílii proběhlo několik studií kladoucích si za cíl odhalení diverzity trypanosomatid u fytofágních ploštic se zaměřením na dvouhostitelský rod *Phytomonas*, který může u kultivovaných rostlin působit značné ekonomické ztráty (Sbravate a kol., 1989; Batistoti a kol., 2001; Godoi a kol., 2002). Sbravate a kol. (1989) vyšetřili celkem 53 různých druhů ploštic (celkem 372 jedinců) z čeledí Coreidae, Pyrrhocoridae, Pentatomidae a Lygaeidae. Zjistili, že celková prevalence nákazy trypanosomatidy je značně vysoká (36 %) a nejčastěji parazitovanou čeledí je čeleď Coreidae. Bičíkovci byli izolováni z 28 druhů ploštic, u kterých předtím nebyli detekováni. Druhovú identifikace byla provedena na základě přítomnosti enzymů ornithin-argininového cyklu, a tak byly jednotlivé izoláty přiřazeny do rodů *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* a *Phytomonas*. V dalším průzkumu brazilského území bylo odchyceno 402 jedinců ze čtyř čeledí (Coreidae, Lygaeidae, Pentatomidae a Pyrrhocoridae) (Batistoti a kol., 2001). Trypanosomatida byla odhalena u více než poloviny odchycených ploštic. Prevalence nákazy mezi jednotlivými čeleděmi byla obdobná jako v předchozí studii. Bylo získáno 49 nových izolátů, které byly rozděleny také dle přítomnosti enzymů ornithin-argininového cyklu, ale navíc i podle morfologických charakteristik a molekulárně taxonomických značek (SL a ribozomální geny). Dle těchto metod byly izoláty rozděleny do rodů *Crithidia*, *Leptomonas* a *Phytomonas*.

Svojí velkou druhovou rozmanitostí zahrnující i hmyz je známá Kostarika. Prozkoumáním tohoto klíčového biotopu by mohlo být odhaleno mnoho nových druhů trypanosomatid. Popis plného rozsahu diverzity těchto hmyzích parazitů byl cílem předběžné studie od Westenbergera a kol. (2004). Jejich průzkum zahrnoval ploštic osmi čeledí – Alydidae, Coreidae, Largidae, Miridae, Pentatomidae, Pyrrhocoridae, Reduviidae a Rhopalidae (celkem 257 jedinců). Infikováno bylo 62 ploštic, avšak kultura byla získána v pouhých 29 případech. Proto byla aplikována metoda genotypizace bez potřeby kultivace jednotlivých kmenů založená na sekvenci pro gen SL RNA (viz výše). Na základě této metody byly získané izoláty rozřazeny do 18 jedinečných typových jednotek (TU), které

mohou reprezentovat nové druhy a v některých případech i nové rody. Na fylogenetickém stromě netvoří tyto TU samostatnou jednotku, ale jsou rozmístěny na různých místech. Na tuto studii navazuje a doplňuje ji Maslov a kol. (2007). V jejich práci je kromě Kostariky navíc zahrnuta oblast Ekvádoru. Celkem bylo analyzováno 690 kusů heteropterního hmyzu z 16ti čeledí, přičemž trypanosomatida byla pozorována ve 154 případech. Nakažená hemiptera náleží do devíti čeledí: Alydidae, Coreidae, Largidae, Lygaeidae, Miridae, Pentatomidae, Pyrrhocoridae, Reduviidae a Rhopalidae. Po sekvenaci genu pro SL bylo odhaleno 30 nových typových jednotek. Tyto studie nečekaně odhalily velkou diverzitu jednohostitelských trypanosomatid a můžeme proto usuzovat, že většina druhů je zatím neobjevena.

Některé typové jednotky už byly charakterizovány po morfologické i molekulárně-fylogenetické stránce a byly popsány jako nové druhy (Yurchenko a kol., 2006, 2008, 2009; Maslov a kol., 2010). Kmen izolovaný z dravé plošnice *Ricolla simillima* (Reduviidae) korespondující s TU36 byl přiřazen k rodu *Leptomonas* a pojmenován *L. costaricensis* (Yurchenko a kol., 2006b). Jedná se o trypanosomatida, který se s vysokou statistickou podporou přidružil k leishmaniím a představuje tak velmi blízkou linii těmto dvouhostitelským parazitům. Dalšími popsánymi druhy byly *L. acus*, *L. bifurcata* a *L. tarcoles* (Yurchenko a kol., 2008), jenž každý odpovídá samostatné typové jednotce (TU3, TU4 a TU40) izolovaných z ploštic čeledi Miridae (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007). U těchto kmenů je třeba si povšimnout nesrovnalosti mezi morfologií a molekulární fylogenetikou. V kultuře byly pozorovány promastigotní formy bičíkovců a na základě této skutečnosti byly předběžně přiřazeny k rodu *Leptomonas*, ačkoliv jejich pozice na fylogenetickém stromě je v blízkosti rodu *Crithidia* (Yurchenko a kol., 2008). Tyto výsledky jasně ukazují, že současná morfologická klasifikace na úrovni rodu je zavádějící a je nutná revize celého systému.

V rámci některých studií byla popsána současná přítomnost více parazitů v jednom hostiteli (např. Maslov a kol., 2007). Tyto smíšené infekce mohou představovat problém při získání kultury, která by věrně reprezentovala původní popis druhu (viz dříve zmíněný případ s různými druhy a rody, které však sekvenčně odpovídají wallaceině). K vyřešení této překážky byla s úspěchem využita amplifikace genu pro SL RNA jednak z buněk parazita získaných při pitvě ze střeva plošnice, a pak z buněk narostlých v kultuře. Právě tímto porovnáním se odhalí přítomnost několika trypanosomatid v jednom hostiteli. Ze směsných infekcí bylo popsáno několik nových druhů (*L. jaderae*, *L. neopamerae*, *C. insperata*, *C. abscondita* a *C. permixta*) (Yurchenko a kol., 2009). V případě těchto druhů byly v plošnici



popsány buňky morfologicky odpovídající epimastigotům, ale v kulturách se již dále množili promastigoti nebo choanomastigoti. Epimastigotní morfotyp by měl v současnosti vyjadřovat příslušnost k rodu *Blastocrithidia*, a právě u tohoto rodu může být často kultivace neúspěšná, a pokud jsou navíc v hostiteli přítomny další trypanosomatida, mohou záhy blastocrithidie vytěsnit z kultury.

Posledními popsánymi druhy jsou *L. barvae* a *B. largi* (Maslov a kol., 2010). Druh *L. barvae* spolu s *L. costaricensis* izolované ze stejné lokality (Yurchenko a kol., 2006b) představují nejbližší příbuzné leishmanií. Tento nález posiluje tvrzení, že rod *Leishmania* je odvozen od monoxenních trypanosomatid hmyzu. Druh *B. largi* je charakterizován epimastigotním morfotypem a tvorbou flagelárních cyst. Dle fylogenetických analýz se jedná o příbuzný druh *B. triatoma*. Fylogenetická pozice linie tvořené těmito druhy je dosud nejasná, ačkoli objasnění tohoto problému by mohlo napomoci vysvětlení původu a evoluce skupiny Trypanosomatidae. Na přítomnost cyst u těchto organismů by mělo být nahlíženo jako na plesiomorfni znak, neboť cysty se vyskytují i u bodonidů, od kterých vede cesta k předchůdci všech trypanosomatid (Simpson a kol., 2000). Správné umístění těchto parazitů v rámci celkového fylogenetického stromu může potvrdit nebo vyvrátit tuto teorii.

Nejnovější studie zaměřená na rozličnost fauny trypanosomatid, která se vůbec poprvé zaměřila na asijský kontinent, pochází z území jihozápadní Číny (Votýpka a kol., 2010). V rámci ní bylo vyšetřováno přes 400 ploštic reprezentujících 79 druhů z 21 čeledí. Celková prevalence nákazy trypanosomatidy u čínských druhů činila 16 %. Přítomnost těchto parazitů byla zaznamenána u 19 druhů heteropter (67 jedinců) z deseti čeledí (Alydidae, Belostomatidae, Coreidae, Geocoridae, Gerridae, Largidae, Pentatomidae, Pyrrhocoridae, Reduviidae, Rhyparochromidae). Fylogenetická analýza genu pro SL RNA rozdělila získané izoláty do 15ti typových jednotek rozestých v rámci celého fylogenetického stromu společně s americkými a evropskými druhy, naznačujíc tak, že zde chybí dlouhá a samostatná evoluce monoxenních druhů oddělených geograficky. Jedenáct typových jednotek představuje potenciálně nové druhy, zatímco ostatní čtyři typové jednotky se shodují s již dříve popsánymi izoláty z území Jižní Ameriky (Maslov a kol., 2007). Z této skutečnosti lze usuzovat na celosvětové rozšíření daných druhů trypanosomatid. Zároveň některé izolované kmeny svědčí o jisté míře endemismu.

Všechny tyto práce potvrzují, že jednohostitelská trypanosomatida hmyzu jsou vskutku diverzifikovanou skupinou bičíkovců. Variabilita jednotlivých izolátů je značná, avšak předpokládá se, že většina druhů teprve čeká na své objevení.

## 2.6 Lokalizace a interakce jednohostitelských trypanosomatid s ploštičím hostitelem

Přesné místo infekce ploštic jednohostitelskými trypanosomatidy je málokdy uváděno. Tito paraziti se zpravidla nachází ve střevě, a to nejčastěji v jeho střední části. Zřídka bývá pozorována přítomnost trypanosomatid v zadním oddílu střeva (Votýpka a kol., 2010). Přidružené orgány střevního traktu (Malphigické trubice, slinné žlázy) mohou být také infikovány (Sbravate a kol., 1989; Moraes a kol., 1994, Godoi a kol., 2002; Votýpka a kol., 2010). V některých případech se mohou trypanosomatida objevit v hemolymfě (Moraes a kol., 1994) a také byla popsána přítomnost těchto parazitů v ovariích (Porter, 1909).

Slinné žlázy představují samostatnou jednotku. Obecná struktura zahrnuje hlavní žlázu složenou z jednoho až několika laloků, která je připojena pomocí prodlouženého tenkého kanálku k tubulární nebo vesikulární přídatné žláze. Kanálky hlavní žlázy se spojují a tvoří slinný duktus, který vede k slinné pumpě a odtud do slinného kanálu tvořeného maxilárními stylety. V hlavní žláze se zpravidla tvoří hydrolytické enzymy, zatímco přídatná žláza může sloužit jako exkretorický orgán.

Zažívací trakt ploštic (Heteroptera) je tvořen třemi hlavními oddíly: přední střevo (stomodeum, foregut), střední střevo (mezenteron, midgut) a zadní střevo (proktodeum, hindgut). Struktura střeva u nymfálních stádií a dospělců je v zásadě stejná. Přední střevo sestává z prodlouženého a chitinem vyztuženého jícnu připojeného přes cibariální pumpu k potravnímu kanálu tvořeného maxilárními stylety. Jícen se může velmi odlišovat svou délkou, ale nikdy se nediferencuje do pravého volete jako je tomu u jiných skupin hmyzu. Střední střevo je entodermálního původu a může být dále různě rozděleno v závislosti na skupině ploštic. U většiny skupin se skládá ze dvou až tří sekcí. U skupiny Pentatomorpha bývá často rozdělen do čtyř a zřídka pěti částí. Nejpřednější část středního střeva je prostorná komora tvořící vlastní orgán trávení – žaludek. Zbývající části středního střeva mohou být značně různorodé. Pylorus (nebo ileum) není vyztužen chitinem, a proto se bude spíše jednat o část pravého střeva než střeva zadního. Může být vyvinut úplně, částečně u skupiny Pentatomorpha nebo nemusí být přítomen. Z tohoto úseku střeva se také odvětvují Malphigické trubice buď jako anteriorní a posteriorní pár u Pentatomorpha nebo jako ventrální a dorzální pár u ostatních skupin. Malphigické trubice se mohou značně lišit v délce a hlavním uspořádání. Mezi pylorem a zadním střevem bývá umístěna výrazná pylorická valva (nebo ileorektální) tvořená z kužele malých cylindrických buněk, které jsou obklopeny silnými okružními svalovými vlákny. Zadní střevo je v první řadě tvořeno rektem hruškovitého tvaru. Anterodorzální část bývá přeměněna v rektální žlázu. Jedná se o relativně

rozsáhlou oblast specializovaných buněk, kterým je přisuzována důležitá funkce v extrakci vody z hemolymfy (Schuh a Slater, 1995).

Průběh nákazy ploštic a životní cyklus jednohostitelských trypanosomatid byl popsán u několika druhů např. u *Leptomonas jaculum* z ploštice *Nepa cinerea* (Porter, 1909), u *Blastocrithidia gerridis* z ploštice *Gerris remigis* (Becker, 1923a), u *Blastocrithidia familiaris* z ploštice *Cenaeus carnifex* (Gibbs, 1950) a u *Blastocrithidia sandoni* z ploštice *Holopterna alata* (Gibbs, 1951). U posledně jmenovaného druhu je životní cyklus parazita popsán následovně: nový hostitel se nakazí tzv. rezistentními tělísky (pseudocysty), které se ve střední části střeva přemění na epimastigoty. Poté se začnou vytvářet menší epimastigotní formy. Obě tyto morfy se později vyskytují v zadní části střeva. Rektum je místo, kde se tvoří rezistentní tělíška. Tyto tělíška se nachází na bičíku mateřské buňky (označují se jako „straphangery“) přichycené k rektální stěně. Později se uvolňují a spolu s trusem opouští hostitele.

Ve střevě najdeme dva typy buněk – přichycené (haptomonády) a volné (nektomonády). Přichycení k tkáním hostitele může být zprostředkováno několika způsoby. Ke kutikulární vrstvě v zadním střevě dochází k adhezi parazita pomocí hemidesmosomů (Laugé a Nishioka, 1977; Tieszen a kol., 1986; Tieszen a Molyneux, 1989a). Některé druhy trypanosomatid hemidesmosomy nevytváří a zůstávají v zadním střevě jako volné formy (Moraes a kol., 1994; Romeiro a kol., 2003). Ve středním oddílu střeva je situace komplikovaná přítomností extracelulární matrix pokrývající vrstvu mikrovilů a bránící tak průniku parazitů. Pomocí penetrace této vrstvy nebo nalezením místa, kde není matrix přítomná, se mohou bičíkovci přichytit. Je popsáno několik typů interakcí: (1) jednotlivé nemodifikované bičíky se mohou proplést mezi mikrovily (druh *B. gerridis* v ploštici *Gerris odontogaster*) (Tieszen a kol., 1983). V Malphigických trubicích dochází k ukotvení (2) pomocí expandované cytoplasmy bičíku mezi mikrovily (Tieszen a Molyneux, 1989a). Tento typ uchycení byl pozorován i v případě nákazy druhem *Blastocrithidia triatoma* ve středním střevě ploštice *Triatoma infestans* (Jensen a kol., 1990). V případě infekce Malphigických trubic ploštice *Gerris odontogaster* trypanosomatidem *Crithidia flexonema* byl tento parazit také lokalizován intracelulárně v buňkách Malphigických trubic (Tieszen a Molyneux, 1989a). Další možnost uchycení (3) koreluje s vývojem přichycovacích plaků v podobě komplexů spojů mezi buňkami parazita a střeva (Tieszen a kol., 1983). Poslední typ ukotvení (4) zahrnuje interakci ne bičíku, ale samotné buňky parazita, na jehož povrchu jsou vytvořeny četné záhyby, pomocí nichž dochází ke kontaktu s hostitelskou buňkou a k přichycení. Tento způsob byl poprvé popsán u ploštice *Triatoma infestans* parazitovaného druhem

*Blastocrithidia triatoma* (Schaub a kol., 1992). Dalším přídatným ukotvením je propojení jednotlivých bičíků pomocí makulárních desmozomů (Tieszen a kol., 1989).

V některých případech byla popsána redukce mikrovilární vrstvy ve střevě ploštic způsobená přítomností trypanosomatid. Jednalo se o nákazu druhu *Blastocrithidia gerridis* (Tieszen a kol., 1983) a *B. triatoma* (Jensen a kol., 1990; Schaub a kol., 1992). Parazit *B. triatoma* je považován za patogení druh (Schaub, 1994) a vliv tohoto parazita na hostitele byl podrobněji studován. Redukce mikrovilů vede k poškození funkce střeva, jehož následkem nejsou ploštice schopny správně trávit nasátou krev a nestrávený hemoglobin se tak dostává do hemolymfy nebo je defekován (Schaub a Meiser, 1990). Bylo také zjištěno, že nákaza negativně ovlivňuje vývoj nymf druhu *Triatoma infestans* a zvyšuje jejich mortalitu (Schaub, 1990). Tento druh parazita má negativní vliv i na mutualistické bakterie přítomné ve střevě krevsajících triatom – dokáže značně zredukovat jejich počet, a tak ovlivnit vývoj svého hostitele, který je na těchto bakteriích závislý (Eichler a Schaub, 2002). Dále ovlivňuje exkreci a schopnost správné tvorby kutikuly a zbarvení (Schaub, 1988; Schaub a kol., 1990). Vzhledem k značné patogenitě se uvažovalo, že by mohl být tento druh trypanosomatida využit při biologickém boji proti svým hostitelům – přenašečům Chagasovy choroby. U ploštic čeledi Gerridae může mít též nákaza jednohostitelskými trypanosomatidy negativní dopad na celkovou dobu vývoje, velikost těla dospělce, mortalitu a příjem potravy (Arnqist a Mäki, 1990; Klingerberg a kol., 1997).

Některé druhy trypanosomatid mají schopnost způsobit přímo úhyn hostitele, a to i za běžných životních podmínek (např. *B. triatoma*, *L. pyrrocoris* ad.) (Schaub, 1994). Experimentální nákaza ploštice *Veneza zonata* izoláty 563TD a 714TD (oba blíže neurčené druhy rodu *Leptomonas*) odhalila, že oba izoláty jsou schopny penetrovat stěnu střeva a infikovat hemolymfu. V případě kmenu 563TD byl úhyn pozorován do 24 hodin následkem bakteriální septikémie, která byla pravděpodobně zapříčiněna rozdílným způsobem penetrace střeva u tohoto kmene a dále inhibicí obraných mechanismů ploštice (Baccan a kol., 2001).

## **2.7 Distribuce a hostitelská specifita jednohostitelských trypanosomatid**

V současnosti existují dva modely zabývající se rozšířením velmi malých organismů včetně prvoků. První tzv. „ubikvitní“ model je moderní verze Beijerinckova výroku: „vše je všude, prostředí vybírá“. Je založen na domněnce, že mikroorganismy jsou tak početné, že jejich rozšíření je zřídka, jestli vůbec, omezeno geografickými bariérami (Finlay, 2002).

Druhý model „mírného endemismu“ tvrdí, že většina druhů má kosmopolitní rozšíření, ovšem existují i endemiti (Foissner, 2006).

U parazitických prvoků je otázka distribuce složitější z důvodu vazby na hostitelský organismus. Rozšíření trypanosomatid bude tedy dáno aktuálním rozšířením jejich hostitele nebo hostitelů. Distribuce těchto bičíkovců bude také ovlivněna mírou hostitelské specifity. Jako příklad může posloužit tzv. glosinový pás, který ovlivňuje i rozšíření dixenního parazita *Trypanosoma brucei* závislého na svém přenašeči – glosině.

Otázka hostitelské specifity u jednohostitelských trypanosomatid není dosud plně vysvětlena. Dříve se uvažovalo, že míra hostitelské specifity je vysoká. Takový přístup vedl k popisům jednotlivých druhů z každého objeveného hostitele. Vysoká hostitelská specifita byla popsána např. u druhu *Leptomonas pulexsimulantis* z blechy *Pulex simulans* (Beard a kol., 1989). Experimentální nákaza blízké příbuzné blechy *Ctenocephalides felis* tímto parazitem se totiž nezdařila.

Široká hostitelská specifita byla naopak zdokumentována u izolátů ze severu Ruska. U jednotlivých kmenů *Leptomonas* sp. F5 a F6, *Blastocrithidia gerricola* KV1 a *B. miridarum* BM4 získaných z několika heteropterních čeledí (Gerridae, Miridae, Nabidae) byla prokázána vysoká míra příbuznosti. I přes značnou morfologickou variabilitu jednotlivých izolátů se jedná pravděpodobně o stejný druh, o kterém můžeme prohlásit, že má nízkou hostitelskou specifitu a navíc dosahuje značného geografického rozšíření (viz dříve zmíněná pravděpodobná záměna dvou druhů v ploštici a kultuře, kap. 2.5). Vzdálenost mezi lokalitami odchytu hostitelského hmyzu činila až 1 500 km (Podlipaev a kol., 2004a).

Naopak jisté geografické resp. biotopové omezení bylo pozorováno u některých ploštic na severu Ruska. Druhy *Salda littoralis* a *Saldula pallipes* jsou jediné ploštice nacházející se v supralitorální zóně Bílého moře, kde žijí pod vrstvou chaluh. U takto izolovaných hostitelů se předpokládalo objevení neobvyklého druhu trypanosomatida. Z rozdílných jedinců *S. littoralis* byly ve stejný den získány dva izoláty zařazené do rozdílných rodů – *Leptomonas* sp. PL a *Wallaceina* sp. Wsd. Zároveň z druhu *S. pallipes* byla izolována leptomonáda Sld, u které se prokázala podobnost s druhem *Leptomonas* sp. PL, svědčící o nízké hostitelské specifitě. Tato skutečnost by mohla být vysvětlena predací jednoho druhu ploštice na druhém (Kostygov a kol., 2004).

Průzkum biodiverzity trypanosomatid založený na molekulárně-fylogenetických metodách, během kterého se operuje s typovými jednotkami jako zástupnou jednotkou pro druh, významně rozšířil dostupný dataset objevených trypanosomatid. Na tomto základě se nechají budovat teorie a hypotézy o biologii a rozšíření těchto parazitů.

Studie proběhlé v Kostarice a v Ekvádoru však neposkytují rozuzlení otázky hostitelské specifity. Nevysledoval se žádný preferenční vztah mezi objevenými parazity

a jejich hostiteli. Ukázalo se, že druhy trypanosomatid se objevují v širokém spektru hostitelů a naopak v jednom hostiteli se může vyskytovat více parazitů. Nízkou hostitelskou specifitu je možné demonstrovat na příkladu skupiny izolátů TU32, které byly nalezeny v ploštících z čeledí Miridae, Coreidae a Reduviidae. Přítomnost tohoto parazita u dravého druhu z čeledi Reduviidae by se mohla vysvětlit predací a schopností trypanosomatida přežít omezenou dobu i v nevhodném hostiteli. Ovšem toto vysvětlení se nedá použít v případě výskytu stejné typové jednotky u různých čeledí a jejich zástupců, kteří nejsou draví, např. TU29 z čeledí Coreidae a Pentatomidae. Vyšší stupeň specifity byl také zaznamenán např. u jednotky TU6/7, která byla nalezena u několika druhů ploštic z jedné čeledi Alydidae (Maslov a kol., 2007).

Sklobení těchto poznatků s výsledky průzkumu fauny trypanosomatid v Číně (Votýpka a kol., 2010) vede k zajímavým závěrům týkajících se geografického rozšíření těchto prvoků. Čínská typová jednotka Ch1 nalezená ve třech hostitelských čeledích (Alydidae, Geocoridae, Pentatomidae) odpovídá kostarickému izolátu TU44 nalezeném v čeledi Coreidae (Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010). Tento druh parazitického organismu tedy vykazuje širokou hostitelskou specifitu, pomocí které dosáhl celosvětového rozšíření. Dalším způsobem, jak se stát kosmopolitním druhem, je parazitace s vyšší specifitou v ploštících pouze jedné čeledi, avšak s globálním rozšířením. Jako doklad může posloužit případ izolátů TU6/7 z Ameriky a Ch14 z Číny popsanych z různých druhů čeledi Alydidae. Tyto příklady podporují ubikvitní model distribuce mikroorganismů. Najít odpověď na otázku, zda se vyskytují také endemiti, bude složitější vzhledem k dosud omezenému množství získaných izolátů a nedostatečnému odběru vzorků z jiných regionů. Jako doklad pro model mírného geografického endemismu může posloužit čínská typová jednotka Ch7. Tento izolát byl mnohokrát objeven u ploštic patřících do několika čeledí (Belostomatidae, Coreidae, Gerridae a Pentatomidae), ale v průběhu jihoamerických studií nebyl nikdy nalezen. Jak se zdá, tento parazit s širokou hostitelskou specifitou měl nedostatek času, aby se stihl rozšířit i na jiná území. Tomu by nasvědčovala i skutečnost, že linie Ch7 na fylogenetickém stromě je relativně krátká, což naznačuje nedávný vznik tohoto druhu (Votýpka a kol., 2010).

Je jisté, že bude třeba dalších rozsáhlých studií k tomu, aby se mohl vytvořit model týkající se rozšíření jednohostitelských trypanosomatid. Do těchto úvah se bude muset zahrnout i hostitelská specifita. Vazba parazita na svého hostitele může dosahovat různého stupně. Jsou známy druhy trypanosomatid parazitující v širokém spektru hostitelů, zároveň se však v jednom hostitelském druhu nachází více druhů trypanosomatid. Dokonce se více druhů bičíkovců může objevit zároveň v jediné ploštici, avšak tyto smíšené infekce nebývají časté (Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010).

## 2.8 Cesty přenosu jednohostitelských trypanosomatid

Možnosti, jak se jednohostitelská trypanosomatida přenáší mezi hostiteli, nebyly dosud dostatečně popsány. Převládá názor, že se tak děje prostřednictvím kontaminace prostředí samotnými bičíkovci nebo pseudocystami. Dalšími uvažovanými způsoby jsou koprofágie a kanibalismus.

### Pseudocysty

U několika druhů jednohostitelských trypanosomatid náležících do rodů *Blastocrithidia* a *Leptomonas* byla popsána v průběhu jejich životního cyklu tvorba pseudocyst (amastigotních stádií) (Wallace, 1966). Dle analogie s jinými prvoky (např. améby a giardie) jsou tato stádia považována za rezistentní formy těchto bičíkovců, ačkoli dosud není mnoho známo o jejich fyzikální nebo chemické odolnosti. Jejich role spočívá v šíření infekce mezi hostitelským hmyzem. Jelikož se pseudocysty uvolňují do prostředí s trusem hostitele, hlavní cesty přenosu budou kontaminace prostředí a koprofágie (Porter, 1909; McGhee a Hanson, 1962; Schaub a kol., 1989).

V literatuře se rozlišuje několik typů pseudocyst: (1) „straphangery“ nebo flagelární pseudocysty, které vznikají nerovnoměrným dělením buňky, zůstávají připojeny k mateřskému organismu, dokud není excystace hotová. (2) Vnitřní pučení u druhu *Blastocrithidia euryophthalmi*. Tento způsob tvorby cyst byl však popsán pouze jednou (McCulloch, 1917 cit. dle Wallace, 1966) a nikdo další už se o tomto pučení nezmiňuje. (3) Pravé cysty u *Leptomonas capsularis*, které vznikají diferenciací ke střevu přichycených promastigotů ve volné cysty obklopené rosolovitou strukturou (McGhee a Hanson, 1962; Wallace, 1966; shrnul Tieszen a kol., 1985). Mezi nejběžněji pozorovaný typ patří (4) pseudocysty, které byly pozorovány u několika druhů trypanosomatid (např. *B. triatoma*e, několik druhů rodu *Leptomonas* u blech) (Peng a Wallace, 1982; Molyneux a Croft, 1980).

Studie týkající se ultrastruktury a procesu encystace existují pro druhy *Blastocrithidia* spp. izolovaných z ploštic (Schaub a Pretsch, 1981; Tieszen a kol., 1985; Reduth a Schaub, 1988) i pro druhy *Leptomonas* spp. z ploštic (Laugé a Nishioka, 1977; Tieszen a kol., 1989; Takata a kol., 1996; Romeiro a kol., 2000; Malysheva a kol., 2006), z blech (Molyneux a Croft, 1980) a motýla (Abe, 1980). Prokázalo se, že tyto pseudocysty postrádají pravou cystovou stěnu (Molyneux a Croft, 1980; Peng a Wallace, 1982; Reduth a Schaub, 1988; Takata a kol., 1996; Romeiro a kol., 2000; Malysheva a kol., 2006), jak je známá u jiných skupin prvoků. Ovšem i přesto jsou tato stádia značně odolná proti vyschnutí (Schaub a Pretsch, 1981). Pod buněčnou stěnou se nachází homogenní subpelikulární vrstva. Její

přítomnost byla popsána u druhů *B. triatomae* (Peng a Wallace, 1982), *B. familiaris* (Tieszen a kol., 1985), *Leptomonas* sp. (Takata a kol., 1996) a *L. wallacei* (Romeiro a kol., 2000). V této vrstvě se mohou objevit subpelikulární mikrotubuly (Takata a kol., 1996), ale u druhu *B. triatomae* nebyly pozorovány (Reduth a Schaub, 1988). V průběhu encystace druhu *B. familiaris* mizí subpelikulární tubuly poté, co se vytvoří homogenní subpelikulární vrstva (Tieszen a kol., 1985). Tato vrstva je u *B. triatomae* tvořena proteiny uspořádanými v řadách (Reduth a Schaub, 1988). Síla této vrstvy u *L. wallacei* naznačuje, v jaké fázi encystace se pseudocysta nachází (Romeiro a kol., 2000). Cytoplasma pseudocysty je velice kondenzovaná, elektrondensní a je v ní velmi těžké pozorovat vnitřní struktury (Schaub a Pretsch, 1981). S využitím metod mrazového leptání a mrazového lámání se zjistilo, že vnitřní část pseudocysty je vyplněna jádrem a kinetoplastem. Oblast mitochondrie s kinetoplastem mívá u neecystovaných stádií pravidelný tvar, zde může mít amébovitý tvar nebo může být deformovaná přítomností vakuol. Endomembránový systém je také málo vyvinut. Bičík s bazálním tělískem nebyl identifikován (Reduth a Schaub, 1988).

Průběh encystace byl popsán několika způsoby. Vznik straphangerových pseudocyst byl popsán u druhu *L. oncopelti* (McGhee a Hanson, 1962). Tyto amastigotní formy se diferencují z promastigotů a pak zůstávají přichyceny k jejich bičíku. Během encystace se nejdříve jádro dostává do blízkosti kinetoplastu. Tento děj je následován nerovnoměrným dělením buňky, které dají vzniknout čtyřem amastigotním formám. Ty jsou přichyceny k mateřskému bičíku poblíž flagelární kapsy. U odpojených pseudocyst byla nadále pozorována schopnost dělit se. Proces encystace *L. oncopelti* byl později popsán podrobněji (Malysheva a kol., 2006). Nerovnoměrné dělení buňky je zahájeno na laterální straně aktivní formy parazita. Z něj se tak oddělí malá dceřiná buňka C1, která zůstává přichycena anteriorním koncem k buňce mateřské. Buňka C1 se dále dělí. Nejdříve vznikají dvě ekvivalentní buňky C2 a pak čtyři morfologicky neodlišitelné buňky C3, které jsou namísto bičíku vzájemně propojeny cytoplasmatickými výběžky pomocí desmosomů.

Romeiro a kol. (2000) navrhli nový model encystace straphangerových cyst u druhu *L. wallacei*. Na rozdíl od pozorování encystace u *L. oncopelti*, jsou zde k bičíku připojeny 1 až 4 pseudocysty, u nichž nebylo pozorováno dělení. Vznik pseudocyst je zahájen standardním dělením buňky. Vzniklé dceřiné buňky zůstávají přichyceny k bičíku a jedna z nich projde diferenciací. Tento proces zahrnuje odlupování membrány, kondenzaci cytoplasmu a reabsorbci bičíku, zatímco u druhé buňky začíná nový proces dělení.

Druh *B. triatomae* je také charakterizován přítomností straphangerových pseudocyst, u nichž však nebyl prokázán vznik nerovnoměrným dělením buňky. Existuje názor, že



jednotlivé pseudocysty vznikají z jiných buněk a následně se připojí k bičíku druhé buňky (Peng a Wallace, 1982). Ačkoli tento předpoklad nebyl potvrzen. Jelikož se zvyšujícím se stářím kultury přibývá volných pseudocyst, nevzrůstá počet bičíkovců s navázanými straphangery ani počet pseudocyst navázaných na jedné pohyblivé buňce.

Naprostě odlišný způsob encystace byl pozorován u druhů *L. mycophilus* (Frolov a Skarlato, 1990), *L. jaculum* (Frolov a kol., 1991) a *L. bombycis* (Abe, 1980). Prvním stupněm diferenciací pseudocyst u *L. mycophilus* je formování rozet z volně se pohybujících dlouhých promastigotů. Proliferující promastigoti dávají vzniknout menším promastigotům, kteří postupně opouštějí rozety. Dělení krátkých promastigotů je provázeno kondenzací cytoplasmy, vchlipováním plasmatické membrány, vznikem densní subpelikulární vrstvy a degenerací bičíku (Frolov a Skarlato, 1990). U druhu *L. bombycis* byla na promastigotech uvolněných z rozet přítomna acidofilní látka. Navíc u těchto promastigotů byla objevena přítomnost dvou jader, což by mohlo svědčit pro přítomnost sexuálního rozmnožování (Abe, 1980).

Endomastigoti druhu *Wallaceina incostans* vykazují jisté změny, pokud jsou ponechány jeden den na vzduchu. Tyto změny se týkají struktury povrchu, bičíku a flagelární kapsy, cytoplasmy, endomembránového systému, mitochondrie, kinetoplastu a jádra. Takováto transformace připomíná proces encystace u rodů *Leptomonas* a *Blastocrithidia*, a tak by endomastigoti mohli hrát roli při přenosu tohoto druhu trypanosomatida (Frolov a Malysheva, 1992).

Nedostatkem poznatků je stále zahalen procesu excystace. Ta je zahájena růstem bičíku i samotné buňky (Schaub a Pretsch, 1981; Takata a kol., 1996) a u druhu *B. triatomae* dochází k excystaci již 24 hodin po požití novým hostitelem.

### **Transovariální přenos**

Nejefektivnější cestou, jak zajistit přenos, se zdá být transovariální přenos. Ten byl popsán u několika druhů trypanosomatid (shrnutí McGhee a Cosgrove, 1980). U druhů *Blastocrithidia hyalommae* a *B. heamaphysalidis* z klíšťat je tato cesta jediná popsána, avšak odpověď na cestu primární infekce dosud nebyla nalezena (Wallace, 1966). Porter (1909) popsala přítomnost druhu *Leptomonas jaculum* v ováriích ploštice *Nepa cinerea*, kde byla pozorována značná změna morfologie buňky parazita. Záznamy o transovariálním přenosu jsou však staršího data, a nověji bylo provedeno několik studií, kde tato možnost přenosu nebyla potvrzena. Jedná se o nákazu ploštic rodu *Gerris* a jejich parazitů *Crithidia flexonema*

a *Blastocrithidia gerridis* (Tieszen a Molyneux, 1989b), dále byla tato možnost vyvrácena u přenosu *B. triatomae* u ploštic z čeledi Reduviidae (Schaub a kol., 1989).

### **Kontaminace prostředí infekčními stádii**

Jako velmi běžný způsob přenosu se jeví kontaminace prostředí infekčními stádii z trusu (McGhee a Cosgrove, 1980). Hmyzí hostitelé se mohou nakazit z infikované potravy nebo vodního zdroje (McGhee a Hanson, 1962). U trypanosomatid byla prokázána schopnost přežít jistou dobu ve vodě (Clark a kol., 1964; Tieszen a Molyneux, 1989b). V pokusu, kdy do sterilní vody byly přidány trypanosomatida s trusem se zjistilo, že tato doba činí 48 hodin pro druh *C. flexonema* a 30 hodin pro *B. gerridis*. Pokud se při pokusu použili paraziti z kultury, kde nebyly přítomné bakterie z trusu ploštic, vzrostla tato doba dokonce na 8 dní u crithidie a 48 hodin u blastocrithidie (Tieszen a Molyneux, 1989b). Takto kontaminovaná voda pak slouží jako zdroj nákazy. Tento způsob přenosu byl popsán u druhů *C. flexonema* a *B. gerridis* parazitujících u ploštic z čeledi Gerridae (Tieszen a Molyneux, 1989b) a u druhu *C. fascicula* z komára *Culiseta insidens* (Clark a kol., 1964). U posledně jmenovaného druhu byla prokázána schopnost bičíkovce přečkat proměnu larvy komára v dospělce. Nákaza mezi larvami se uskuteční v rámci vodního prostředí. Do vody se crithidie dostanou z trusu dospělců nebo z těl samic, které uhynuly během kladení vajec.

Chování ploštic z čeledi Gerridae nepochybně ovlivňuje přenos a působí také na rychlost šíření infekce v rámci populace. Bylo pozorováno, že různí jedinci bruslařek se mohou příležitostně společně živit na stejné kořisti a během toho defekovat. Pokud se mezi těmito jedinci vyskytuje nakažená ploštice, mohou z trusu do vody uvolněná trypanosomatida zvýšit pravděpodobnost nákazy ostatních neinfikovaných ploštic požitím bičíkovce společně s potravou (Tieszen a Molyneux, 1989b). Prevalence trypanosomatid u bruslařek se mění v průběhu roku. Na jaře se pohybuje okolo 15 až 20 % (Tieszen a Molyneux, 1989b). Vzhledem k tomu, že nakažené ploštice vykazují vysokou míru infekce trypanosomatidy, jedná se o jedince z předešlé sezóny, kteří prezimovali spolu se svými parazity a slouží jako zdroj infekce pro další populaci. V průběhu pozdního jara dochází k nárůstu prevalence na 80 až 100 %. Tento prudký vzestup je následován poklesem. Mezi samčím a samičím pohlavím nebyly pozorovány rozdíly v prevalenci nákazy (Tieszen a Molyneux, 1989b; Arnqist a Mäki, 1990). Zvýšení prevalence se děje v době rozmnožování, kdy dochází k blízkému kontaktu bruslařek, pomocí nichž by také mohlo docházet k přenosu trypanosomatid (Tieszen a Molyneux, 1989b). Druhy trypanosomatid vyskytující se u ploštic čeledi Gerridae vykazují

negativní vliv na své hostitele a dokonce mohou způsobit i jejich úhyn, což by vysvětlovalo snížení prevalence v období léta (Arnqvist a Mäki, 1990; Gurski a Ebbert, 2003).

Přenos kontaminací potravy nebo vodního zdroje byl v laboratorních podmínkách popsán u plošnice *Oncopeltus fasciatus* a jejího parazita *Leptomonas oncopelti*. U tohoto druhu se v průběhu životního cyklu tvoří dvě různá stádia – promastigoti a flagelární pseudocysty. Oba morfotypy je možné izolovat z trusu dospělců, ovšem ne z trusu nymf. Ale i nymfy bývají parazitovány avšak není u nich pravděpodobně dovyvinuta trávící soustava. Posledním svlékáním se tato situace vyřeší – zprůchodní se trávící trubice a paraziti mohou sestoupit do rekta, odkud se uvolní do prostředí (McGhee a Hanson, 1962). O nákaze pomocí kontaminace potravního zdroje trusem se uvažuje i u ploštic z čeledi Reduviidae a jejich parazita *Blastocrithidia triatomae* (Schaub a kol., 1989).

Pokud nejsou pohyblivá stádia trypanosomatid uvolněna do vodního (či vlhkého) prostředí a dojde u nich k vyschnutí, nejsou schopny způsobit infekci (Gibbs, 1950). Pseudocysty jsou naopak proti vyschnutí odolné. V případě much by se infekce mohla šířit pomocí bičíkovců uvolněných s trusem na vlhký povrch masa, na kterém se díky isotonickému prostředí zachová po určité době životaschopnost a schopnost nakazit ostatní mouchy (Becker, 1923b). U některých druhů ploštic byla pozorována také koprofílie a nekrofílie (shrnul Constant, 2007). Heteroptera nacházející se např. na chlévské mrvě a zdechlinách mohou být jak predátorské tak fytofágní druhy. Výskyt predátorů může být vysvětlen množstvím jejich potenciální potravy (larvy a dospělci jiného hmyzu), která může být v tomto prostředí značně agregovaná. Toto chování se zdá být velmi sporadické a pravděpodobně představuje způsob doplňkové potravy. Není nemožné, že trus a zdechliny v určité fázi svého rozkladu obsahují chemické sloučeniny, které jsou velmi podobné agregačním nebo pohlavním molekulám ploštic, a proto jsou k nim přitahovány (Constant, 2007).

U sociálně žijících organismů včetně hmyzu (včely, čmeláci, aj.) dochází k interakcím mezi jednotlivci pomocí sítě kontaktů, které mohou ovlivnit šíření patogenů. Pozice jednotlivce v rámci takové sítě udává riziko infekce (tzv. síťová teorie). Bylo prokázáno, že u včel (a pravděpodobně i u čmeláků) se patogen *Crithidia bombi* šíří v rámci takové sítě (Otterstatter a Thomson, 2007). Tento druh crithidie se může přenášet horizontálně mezi jednotlivci, a to přes kontaminovanou potravu, což je v tomto případě zdroj nektaru (Durrer a Schmid-Hempel, 1994).

Ke zvýšenému množství kontaktů mezi plošticemi dochází při agregaci. Toto chování se nevyskytuje běžně, ale je charakteristické pro některé druhy nebo skupiny ploštic. Navíc se

nemusí objevovat u všech stádií, ale agregovat mohou např. jenom nymfy nebo přezimující stádia. Mezi druhy, u kterých dochází k agregaci, patří např. *Oxycarenus lavaterae*, *Pyrrhocoris apterus*, *Ischnodemus sabuleti* ad. (Wachmann a kol., 2007). Agregáčnı chování bylo pozorováno také u druhu *Gerris remıgis*. Ploštice tohoto druhu se shlukují během podzimu na vodní hladině a hybernují ve skupinách na zemi. Toto chování by tak mohlo usnadnit přenos jednohostitelckých trypanosomatid prostřednictvım vody nebo koprofágie. U bruslařky *G. odontogaster* však toto chování nebylo pozorováno (Tieszen a Molyneux, 1989b).

U některých druhů trypanosomatid byla pozorována schopnost množit se a růst v rostlinách včetně semen a plodů, což může být umožněno vysokým obsahem cukrů v rostlinném pletivu (Conchon a kol., 1989). Z rostlin a jejich plodů (rajče, jablko, granátové jablko, švestka, pomeranč, ananas, grapefruit, kukuřice ad.), které vykazovali známky po vpichu hmyzem, bylo izolováno několik druhů trypanosomatid patřících nejen do rodu *Phytomonas*, ale také do rodů *Leptomonas*, *Crithidia* a *Herpetomonas* (Jankevicius a kol., 1993; Catarino a kol., 2001). Vzhledem k tomu, že všechny ploštice i predátorské druhy doplňují tekutiny sáním na rostlinách, mohou se tak trypanosomatida šířit jak mezi plošticemi, tak mezi rostlinami.

### **Kanibalismus**

Jako další cesta přenosu jednohostitelských trypanosomatid bývá popisován kanibalismus nebo-li vnitrodruhová predace. Toto chování je popsáno u širokého spektra organismů, které zahrnují i hmyz. Zpravidla ke kanibalismu dochází při velké hustotě populace nebo se nedostávají potravní zdroje. Avšak jsou popsány případy, kdy k němu došlo i v případech dostatku potravy a vyskytuje se dokonce i u herbivorního hmyzu (Fox, 1975). U ploštic se vyskytuje i sourozenecký kanibalismus mezi právě se vylíhnutými nymfami (Ohba a kol., 2006).

Takováto cesta přenosu byla popsána u několika druhů jednohostitelských trypanosomatid. Kanibalistické chování bylo popsáno u ploštic z čeledi Reduviidae, které mohou být nakaženy druhem *Blastocrithidia triatomae* nebo dvouhostitelským druhem *Trypanosoma cruzi*. Ploštice zpravidla napadají druhé jedince a vysávají z nich hemolymfu nebo obsah žaludku, čímž nezpůsobí smrt atakovaného jedince. Takto se mohou přenášet jejich paraziti (*B. triatomae*, *T. cruzi*) (Schaub, 1988; Schaub a kol., 1989). Na rozdíl od *T. cruzi* se agresivní ploštice při laboratorním experimentu vždy nakazily druhem *B. triatomae* nezávisle na druhu nasáté krve. To je pravděpodobně způsobeno přítomností pseudocyst

*B. triatoma* v žaludku. K jejich excystaci nedochází přímo v žaludku, ale až v další části střeva (Schaub a Pretsch, 1981), kde už jsou stráveny proteiny komplementu z krve hostitele. Metacyklická stádia *T. cruzi* mohou být lyzována v přítomnosti kuřecí krve. Pokud ploštice předtím sála na myši, nebyl tento jev pozorován (Schaub a kol., 1989).

Jednotlivé druhy se mohou lišit v agresivitě. Schaub a kol. (1989) pozorovali, že u druhů *Triatoma pallidipennis* a *Dipetalogaster maxima* byl kanibalismus pozorován vždy, u druhů *T. infestans* a *T. sordida* se vyskytuje běžně a u druhů *Rhodnius prolixus* a *R. robustus* byl méně častý. Kanibalismus tak může být důležitá cesta přenosu u agresivních druhů, ale nebude tak běžný jako přenos koprofágií.

Tuto cestu přenosu popsala i Porter (1909) u druhu *Leptomonas jaculum* v populaci splešťule (*Nepa cinerea*), kdy oslabené jedince nebo nymfy napadají silnější dospělci. Obecně je kanibalismus široce rozšířen mezi vodními dravými plošticemi. Bruslačky (Gerridae), které přezimovaly, se na jaře páří, nakladou vajíčka a záhy hynou. Tito jedinci mohou představovat možnost snadné potravy a mohou být příčinou kanibalistického chování. Takto se infekce může šířit přímo predací nebo nepřímo, po uvolnění trypanosomatid do vody z uhynulých těl ploštic (Tieszen a Molyneux, 1989b). Také u fytofágní ploštice *Pyrrhocoris apterus* byl pozorován kanibalismus, kterým se může šířit jejich parazit *Leptomonas pyrrhocoris* (Wallace, 1966). U řady ploštic, včetně fytofágních (např. *P. apterus*), je běžně pozorováno sání na čerstvě uhynulých jedincích, při kterém tak může docházet i k přenosu trypanosomatid.

Pro některé druhy ploštic je charakteristické kladení vajec do shluků (viz např. Booth, 1990). Jednotlivá vajíčka jsou k sobě umístěna pomocí lepivé hmoty, která si tuto svoji vlastnost uchovává až do doby, kdy se začínají líhnout nymfy. Líhnutí nymf neprobíhá současně. U dříve narozených jedinců bylo pozorováno, že napadají ostatní, dosud nevylihnutá vajíčka, a živí se jimi a může tak dojít k nákaze trypanosomatidy. Nebylo zatím zjištěno, zda je povrch vajíček pokryt infekčními stádii trypanosomatid uvolněných z trusu nebo zda se tam dostanou jiným způsobem. V případě ploštice *Lygaeus kalmii*, hostící vlastní druh trypanosomatida, jsou např. vajíčka pokrývána cementovou hmotou zčásti tvořenou trusem ploštice. Zda je tato metoda přenosu rozšířená i u jiných druhů trypanosomatid, se dosud neví. Je ale známé, že i jiné druhy ploštic (*Leptoglossus phyllopus*, *Arilus cristatus*, *Acantocephala femorata*) kladou vajíčka do shluků a i u nich nalezneme trypanosomatida. V přírodě však bude pravděpodobnost infekce pozřením vajíček s náhodnou kontaminací trusem zřejmě menší, než nákaza způsobená kanibalistickým chováním nymf (McGhee a Cosgrove, 1980). Příklad infekce nymf z kontaminace popsal Gibbs (1950)

u trypanosomatida *Crithidia familiaris* parazitující u plošnice *Cenaeus carnifex*. Vajíčka jsou kladena ve skupině a jsou pokryta vrstvou půdy. Prvně vylíhnuté nymfy zůstávají schovány pod povrchem a byly pozorovány, jak se živí v hmotou v zemi, která může být kontaminovaná trusem s pseudocystami od samičky. Infekce se u nymf zpravidla objeví ještě předtím, než začnou sít na rostlinách.

### **Koprofágie**

Koprofágie (požívání vlastních i nevlastních odpadních produktů) představuje tři hlavní typy výhod: jsou zdrojem (1) mutualistické fauny, (2) mikrobiálních proteinů a (3) doplňkové potravy (enzymy, metabolity a nestrávené částice) (Weiss, 2006).

Už Porter (1909) popsala přenos druhu *Leptomonas jaculum* u splešťule pomocí koprofágie. Primární infekce nymf je způsobena přítomností bičíkoců i jejich odolných stádií (pseudocyst) na listech, kde dospělé samičky snášejí vajíčka na vodní rostliny a zároveň na ně defekují. Mladé nymfy se pohybují v její blízkosti a spolu s vodou přijímají i trus s infekčními stádií. Tento způsob přenosu by také mohl být zodpovědný za vzestup prevalence v jarním období u ploštic z čeledi Gerridae (Tieszen a Molyneux, 1989b).

Mechanismus přenosu pomocí koprofágie se nevyskytuje pouze u trypanosomatid ploštic. Životní cyklus druhu *Leptomonas pulexsimulantis* z blechy *Pulex simulans* zahrnuje tvorbu amastigotů (pseudocyst). Ty se uvolňují do prostředí společně s trusem, který tvoří součást potravy larev (Beard a kol., 1989).

U skupiny Heteroptera se vyskytují asociace s endosymbiotickou faunou. Striktně krevsající plošnice z podčeledi Triatominae jsou závislé na svých endosymbiotických bakteriích vyskytujících se v jejich trávicím traktu (Eichler a Schaub, 2002). Vzhledem k jejich důležitosti musí dojít k jejich získání alespoň jednou za život plošnice. To se děje prostřednictvím koprofágie. V trusu se ovšem kromě bakterií může vyskytovat trypanosomatid *Blastocrithidia triatomae* a pseudocysty přítomné v trusu se tak mohou dostat do nového hostitele (Schaub a kol., 1989). Zdá se, že tato cesta přenosu *B. triatomae* bude běžnější než kanibalismus.

Endosymbiotické bakterie se však do nové generace mohou přenášet i jinou metodou, a to vertikální cestou z matky na potomstvo. To zahrnuje koprofágií nebo pozření sekretů zanechaných na obalu vajíčka vylíhnutou nymfou. Transovariální přenos byl vyloučen u ploštic z čeledi Pentatomidae, vzhledem k tomu, že bakterie nebyly nalezeny v ováriích ploštic (Prado a kol., 2006). Plošnice z čeledi Plataspidae jsou charakteristické tvorbou jakési „symbiotické kapsuly“, která je umístěna v blízkosti nakladených vajec. Funkce této schránky je velmi důležitá. Spočívá v ochraně symbiontů před environmentálním stresem a zabraňuje

vysychání (Hosokawa a kol., 2005). Takto by se ovšem nemusely přenášet pouze bakterie, ale také trypanosomatida. Zajímavé bude jistě řešení otázky, jak dochází k nákaze mezi plošticemi, u nichž přezimují pouze vajíčka (např. některé druhy z čeledi Miridae) (Wachmann a kol., 2004). Právě tímto mechanismem by se parazit mohl přenášet do následující generace.

Jednotlivé druhy ploštic se liší tím, jaká stadia přezimují. Mohou to být vajíčka, nymfy nebo dospělci. Tieszen a Molyneux (1989b) prokázali schopnost trypanosomatid přežít zimní diapauzu svých hostitelů – bruslařek. Brzy na jaře chycené bruslařky vykazovaly vysokou parazitěmi, což naznačuje, že ploštice byly infikovány dlouhou dobu. Schopnost přezimovat ve svém hostiteli byla popsána i u druhu *Herpetomonas swainei* v pilatce *Neodipron swainei* (Smirnoff a Lipa, 1970 cit. dle Tieszen a Molyneux, 1989b).

### **Nákaza z ulovené kořisti**

U některých jednohostitelských trypanosomatid byla prokázána nízká hostitelská specifita. Důsledkem toho se mohou trypanosomatida přenášet nesespecificky nebo náhodně z kořisti na predátora. Druh *Zelus leucogrammus* je dravá ploštice, u níž bylo nalezeno několik trypanosomatid z různých rodů (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas* a *Leptomonas*) (Podlipaev, 1990). Bylo prokázáno, že pouze jeden druh blastocrithidie je typickým parazitem této ploštice. Pokud se v laboratorních podmínkách krmily ploštice pouze sterilní potravou, jiný druh trypanosomatida u nich nebyl pozorován. Ostatní druhy jsou tedy získány z nakažené potravy tvořené jiným hmyzem (Carvalho a Deane, 1974) a přežívají v nespecifickém hostiteli pravděpodobně jen krátkou dobu.

Tímto způsobem jsou vysvětleny i některé souběžné nákazy v různých druzích ploštic z Jižní Ameriky, které zahrnovaly dravé jedince (Maslov a kol., 2007). Druh *Leptomonas costaricensis* popsáný z dravé ploštice *Ricolla simillima* (Reduviidae) je blízce příbuzný izolátu G755 (Yurchenko a kol., 2006b). G755 je trypanosomatid neznámého původu izolovaný v Guatemale z flebotoma (Noyes a kol., 1997). Oba dva druhy jsou v rámci fylogenetického stromu umístěny v blízkosti dvouhostitelského rodu *Leishmania*, který ve svém životním cyklu využívá flebotomy jako přenašeče. Existuje tedy jistá možnost, že infekce ploštice je výsledkem predace nakaženého flebotoma (Yurchenko a kol., 2006b).

Predací by mohl být také vysvětlen případ severoruských izolátů označených PL a Sld, které jsou považovány za jeden a ten samý druh. Zajímavé je, že byly získány ze dvou různých druhů ploštic z čeledi Saldidae. Tuto skutečnost by nejlépe vysvětlovalo, že jeden druh ploštice se nakazí při požívání kořisti, kterou je v tomto případě druhý druh ploštice (Kostygov a kol., 2004).

Studiu životních cyklů bylo dosud věnováno jen málo pozornosti. Je však zřejmé, že tito paraziti vynalezli mnohá zajímavá řešení, jak se šířit mezi hostiteli.

## **3 MATERIÁL A METODIKA**

### **3.1 Odchyt ploštic**

V průběhu let 2008 a 2009 probíhal odchyt ploštic především na lokalitách v okolí Předboře (49°46' s. š.; 15°42' v. d.) a dále v Turnově (50°37' s. š.; 15°10' v. d.) a jeho okolí. Suchozemské druhy ploštic byly sbírány z vegetace nejčastěji entomologickou smýkací sítí, sklepáváním nebo individuálním sběrem. Pomocí kuchyňského cedníku se odchyťovaly vodní druhy. Živé ploštice určené k vypitvání se ukládaly samostatně do plastových 1,5 ml mikrozkuumavek, aby se zabránilo možnému kontaminativnímu přenosu jednohostitelských trypanosomatid mezi plošticemi.

### **3.2 Pitva ploštic**

Nachytné živé ploštice byly určeny k rychlému vypitvání, prostřednictvím něhož se zjišťovala nákaza trypanosomatidy. Ploštice byly usmrceny pomocí 70% ethanolu, omyty ve fyziologickém roztoku a poté přemístěny do kapky fyziologického roztoku na sterilním podložním skle. Pod binokulární lupou se pomocí ostrých „hodinářských“ pinzet odstranila zadečková část trupu a jemným tahem bylo vytaženo střevo, které se přeneslo do další čisté kapky fyziologického roztoku. Po překrytí sterilním krycím sklem byl preparát prozkoumán na přítomnost trypanosomatid ve světelném mikroskopu Olympus CX31 při celkovém zvětšení 400x. Pro zlepšení viditelnosti pohyblivých buněk bylo využito fázového kontrastu.

Vypitvané ploštice byly vypreparovány a uchovány pro pozdější druhové určení.

### **3.3 Určení ploštic do druhů**

Vypreparované ploštice byly určeny za odborné pomoci Mgr. Petra Kmenta PhD. dle klíčů „Phylogenetic analysis of family groups within the infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera), with emphasis on the Lygaeoidea“ (Annals of the Entomological Society of America, 90, 275–301, Henry, T. J., 1997) a „True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history“ (Cornell University Press, Ithaca, London, 336 pp., Schuh, R. T. & Slater, J. A., 1995). Některé druhy ploštic bylo možno určit až po vypreparování genitálií. V některých případech však byly určovací znaky poškozeny předchozí pitvou natolik, že nebylo možné determinovat je do druhu případně rodu. Lokalizačními a determinačními štítky označené ploštice jsou uloženy ve sbírkách Katedry parazitologie PřF UK v Praze.



### 3.4 Izolace a kultivace trypanosomatid

#### Izolační a kultivační média

##### a) Pevné médium SNB-9

###### Chemikálie:

- Bacto™ Neopepton (Chemos) 2 g
- Bacto™ Agar (Chemos) 2 g
- NaCl (Penta) 0,6 g
- Destilovaná voda – doplněno do 100 ml
- Defibrinovaná králičí krev (Bioveta, a.s.) 20 ml

Médium bylo vyklávkováno a zchlazeno na 50 °C, pak byla ve sterilním boxu přidána králičí krev pomocí 20ml automatické pipety. Následně bylo médium rozpipetováno do sterilních kultivačních nádob: 1) 0,5 ml do 2ml PEN lahviček, 2) 1 ml do plochých kultivačních zkumavek „flat tubes“ (Nunc) vhodných k prohlížení pod inverzním mikroskopem.

##### b) Tekuté médium

###### Chemikálie:

- Schneiderovo D-médium (Lonza)
- Médium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)
- Médium M-199 (Sigma-Aldrich)
- Inaktivované telecí fetální sérum (Vinco)
- Brain Heart Infusion BHI (Gibco)
- Bacto™ Neopepton (Chemos)
- NaCl (Penta)
- Amikin (Bristol-Myers Squibb)
- 5-fluorocytosin (Sigma-Aldrich)
- Ampicilin (Biotika, a.s.)
- Chloramfenikol (Biotika, a.s.)
- Penicilin (Biotika, a.s.)

#### Složení a příprava tekutých médií

a) izolační médium 1: médium RPMI-1640 a Schneiderovo D-médium v poměru 1:1, telecí fetální sérum (10 % celkového objemu), amikin (200 µl/ml), penicilin (10<sup>6</sup> U/ml), fluorocytosin (1500 µl/ml)

Do jedné sterilní nádoby byl odvážen fluorocytosin o hmotnosti 75 mg a rozpuštěn v malém objemu média RPMI-1640 za stálého třepání (cca 5 hodin). Ostatní složky byly smíchány v druhé sterilní nádobě, k nimž byl přes filtr (0,22 µm) přidán zcela rozpuštěný fluorocytosin.

b) izolační médium 2: médium M-199 a BHI (3,7 g/100 ml) v poměru 9:1, telecí fetální sérum (10 % celkového objemu), hemin (10 µl/ml), ampicilin (100 µl/ml), amikin (200 µl/ml), penicilin (10<sup>6</sup> U/ml), fluorocytosin (1500 µl/ml), chloramfenikol (50 µl/ml)

- c) kultivační médium: médium RPMI-1640 a Schneiderovo D-médium v poměru 1:1, telecí fetální sérum (10 % celkového objemu), amikin (200 µl/ml)
- d) „overlay“: 2 g neopepton, 0,6 g NaCl, 100 ml destilované vody, sterilizováno klávováním při 120 °C 25 minut
- d) médium pro U-trubice: médium M-199 a „overlay“ v poměru 1:1, amikin (200 µg/ml)

Jednohostitelská trypanosomatida byla kultivována na dvousložkovém médiu, u kterého byla pevná složka tvořena krevním agarem a tekutou složkou bylo buď kultivační médium nebo izolační médium typu 1. Pokud se v kultuře trypanosomatid objevila kontaminace v podobě bakterií, plísní či kvasinek, bylo zapotřebí kulturu přechistit ve speciálně tvarované zkumavce tzv. U-trubici. Ta byla nejdříve naplněna zhruba do poloviny na živiny chudým médiem a poté bylo do jednoho ramene přidáno pár kapek kontaminované kultury. U-trubice byla uchovávána při 23 °C v termostatu, kdy byla v průběhu následujících dvou dní kontrolována přítomnost trypanosomatid v opačném rameni trubice.

Pokud byl nález při pitvě pozitivní, zaznamenávaly se tyto údaje – charakteristika buněk parazita, lokalizace v zažívacím traktu a intenzita nákazy. Buňky parazita ve střevním roztoku byly nasáty do injekční stříkačky a společně s izolačním médiem typu 1 vpraveny do kultivační lahvičky „PEN“, část buněk z roztoku byla vstříknuta do druhého typu izolačního média rozplněného po 1 ml do 1,5 ml plastových mikrozkuvek. Využitím dvou typů izolačních médií se měla zvýšit pravděpodobnost vykultivování parazitů. Tyto primární kultury byly umístěny do termostatu při 23 °C. Malá část buněk byla uchována v roztoku NET 50 (50 mM EDTA, 10 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8) nebo v elučním pufru (Roche) a uskladněna při -20 °C. Tento environmentální vzorek byl určen pro další analýzy, jež zahrnují neúspěšnou kultivaci nebo odhalení směsných infekcí. Zbytky buněk na podložním skle byly zafixovány methanolem a uschovány pro následující barvení dle Giemsy-Romanovského.

Primární kultura v PEN lahvičkách a v 1,5 ml mikrozkuvkách byla kontrolována v průběhu následujících dnů odebráním kapky média pomocí insulinové injekční stříkačky a prohlédnutím pod světelným mikroskopem. Pokud se v kultuře objevily množící se buňky, byla kultura přeočkována do „flat tubes“. Stav kultury byl pak dále kontrolován pod inverzním mikroskopem a přeočkováán v intervalech určených rychlostí růstu parazita. Jestliže se primární kultura do měsíce nezačala množit, byla kultivace prohlášena za negativní.

Z jednotlivých pasáží kultury byly namnožené buňky sklizeny pro izolaci totální DNA, elektronovou mikroskopii a zhotovení roztěrů. Médium společně s buňkami bylo stočeno (60 sekund; 13,4 rpm) na stolní centrifuze, supernatant byl dekantován a pelet tvořený buňkami dvakrát promyt fyziologickým roztokem.

### **3.5 Kryoprezervace kultur**

Chemikálie:

Dimetylsulfoxid „DMSO“ (Sigma-Aldrich)

Tekutý dusík

Ke kultuře byl přidán dimetylsulfoxid („DMSO“, Sigma-Aldrich) tak, aby bylo dosaženo výsledného 10% zředění. Směs kultury a „DMSO“ byla následně rozpipetována do zamrazovacích ampulí CryoTube™ Vials (NUNC). Ty byly nejdříve umístěny v zamrazovací nádobě (Cryo 1 °C Freezing Container, NALGENE) do -70 °C na 12-24 hodin a pak přemístěny do tekutého dusíku (-196 °C).

### **3.6 Barvení buněk dle Giemsy-Romanovského**

Chemikálie:

Methanol (Lach-Ner, s.r.o.)

Giemsa stain (Fluka)

Dle Giemsy-Romanovského byly barveny preparáty s buňkami trypanosomatid z vypitvaného střeva a buňky získané z kultury. Kapka homogenizovaného peletu sklizených buněk byla přemístěna na odmaštěné podložní sklo a pomocí druhého podložního skla byla rozetřena po celé jeho délce. Dobře zaschlý preparát byl nafixován methanolem (5 minut), usušen, barven 20x naředěným roztokem Giemsy-Romanovského (25 minut) a opláchnut destilovanou vodou.

### **3.7 Měření buněk**

U vybraných izolátů bylo provedeno měření morfologických znaků buněk. Nabarvené preparáty byly prohlédnuty s využitím imerzního oleje za celkového zvětšení 1000x pod světelným mikroskopem Olympus BX51 se zabudovanou kamerou DP-70. U preparátů zhotovených roztěrem kultury bylo vybráno a nafoceno 50 buněk. U preparátů zhotovených po pitvě plošnice bylo vybráno maximální množství buněk, protože tyto preparáty byly méně kvalitní a obsahovaly menší počty buněk. Pomocí programu QuickPHOTO MICRO 2.2 (Olympus) byly vytvořeny snímky a provedeno měření. U jednotlivých buněk byl zaznamenán morfotyp a měřením zjištěny následující parametry: celková délka a šířka buňky, vzdálenost středu jádra a středu kinetoplastu od anteriorního konce buňky a délka bičíku. Hodnoty byly zapsány do tabulky v programu Microsoft Office Excel. Naměřené hodnoty byly analyzovány metodou ANOVA v programu STATISTIKA 6.1 (StatSoft).

### 3.8 Elektronová mikroskopie

Chemikálie:

2,5% glutaraldehyd (Science services; SPI/Chem™)  
0,1 kakodylátový pufr (BDH Chemicals Ltd)  
2% OsO<sub>4</sub> (Science services; SPI/Chem™)  
Destilovaná voda  
vzestupná ethanolová řada (35, 50, 70, 80, 96, 100 %)  
100% aceton (Lachema)  
Pryskyřice Poly/Bed 812/Araldite 502 (Polysciences, Inc.)

Nejdříve byly buňky vybraných kmenů fixovány v 2,5% glutaraldehydu naředěném kakodylátovým pufrem při 4 °C po dobu minimálně 24 hodin. Některé vzorky byly odeslány na další zpracování do Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích, další byly zpracovány na místě s pomocí pracoviště Elektronové mikroskopie PřF UK v Praze.

Glutaraldehydem nafixované vzorky byly promyty 0,1M kakodylátovým pufrem při 4 °C po dobu 12 hodin. Následně byly postfixovány roztokem 2% OsO<sub>4</sub> v 0,1M kakodylátovém pufru při 4 °C po dobu 12 hodin. Takto připravené buňky byly třikrát stočeny a promyty destilovanou vodou. Potom byly jednotlivé vzorky odvodněny vzestupnou ethanolovou řadou, viz schéma:

35% ethanol – 15 minut  
50% ethanol – 15 minut  
70% ethanol – 30 minut  
80% ethanol – 15 minut  
96% ethanol – 15 minut  
100% ethanol – 15 minut.

Do každého kroku bylo zahrnuto stočení buněk, odpipetování supernatantu a promíchání na vortexu s následujícím roztokem. Konečná dehydratace byla provedena pomocí trojnásobného promytí v 100% acetonu po dobu 15 minut. Poté byly dehydratované vzorky převáděny do pryskyřice Poly/Bed 812/Araldite 502 ředěnou 100% acetonem v následujících poměrech a dobách: 1:3 – 2 hodiny

1:1 – 4 hodiny  
3:1 – 12 hodin.

Následovalo převedení takto prosycených kultur do čisté pryskyřice. Jednotlivé vzorky byly třikrát přeneseny do pryskyřice na dobu 12 hodin. Vzniklé bločky byly vloženy do termostatu ke ztuhnutí při 65 °C na 48 hodin. Ostatní potřebné kroky zahrnující přípravu tenkých řezů na síťce byly provedeny v laboratoři elektronové mikroskopie na PřF UK v Praze.

Vzniklé preparáty byly prohlédnuty na transmisním elektronovém mikroskopu TEM JEOL 1011 s CCD kamerou Veleta na pracovišti elektronové mikroskopie na PřF UK v Praze. Bylo vybráno a nafoceno 40 vhodných kinetoplastů, jejichž parametry byly proměřeny v programu QuickPHOTO MICRO. Naměřené hodnoty zahrnující šířku ve středu a na krajích kinetoplastu byly zapsány do tabulky v programu Microsoft Office Excel. Získané hodnoty byly vyhodnoceny metodou ANOVA v programu STATISTICA 6.1 (StatSoft).

### **3.9 Molekulární a fylogenetické analýzy**

#### **3.9.1 Izolace DNA z buněk trypanosomatid**

Chemikálie:

Fyziologický roztok  
NET-50 nebo eluční pufr (Roche)  
High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)  
Isopropanol (Sigma-Aldrich)

Totální DNA byla izolována z buněk získaných z kultury a z environmentálních vzorků trypanosomatid, které byly uchovávány v elučním pufru nebo roztoku NET-50. Izolace DNA byla provedena dle návodu poskytnutného výrobcem kitu High Pure PCR Template Preparation Kit určeného pro izolaci DNA ze savčích tkání. Celková DNA byla standardně eluována do 200  $\mu$ l elučního pufru. V případě environmentálních vzorků, kde byla malá výchozí koncentrace buněk, byla DNA eluována do menšího objemu (50  $\mu$ l).

#### **3.9.2 Analýza RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Chemikálie:

Combi PPP Master Mix (složení: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,02% Tween 20, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dTTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerázy, monoklonální anti-Taq DNA polymeráza (38 nM), stabilizátory a aditiva) (Top-Bio, s.r.o.)

PCR  $\text{H}_2\text{O}$  (Top-Bio, s.r.o.)

Primery: OPE5 (5'→3': TCA GGG AGG T)  
OPE12 (5'→3': TTA TCG CCC C)  
OPD13 (5'→3': GGG GTG ACG A)

Vstupní DNA

Tato analýza byla použita u kultivovatelných axenických izolátů. Podle jejího výsledku byla určena podobnost celkové DNA jednotlivých izolátů. Pro tuto analýzu byly použity primery OPE5, OPE12 a OPD13, které se nám osvědčily na základě předběžných testů při práci s kmeny trypanosomatid izolovaných z ploštic. V tabulce 3.1 je uvedeno složení reakční směsi, která byla po namíchání vložena do termocykleru (BIOER XP Cyclyer, KR D). V tabulce 3.2 je znázorněn průběh teplotního cyklu. Pro stanovení koncentrace DNA ve vzorcích byl použit NanoDrop ND-1000 (Thermo SCIENTIFIC), standardně se pohybovala v rozmezí 50-100 ng/ $\mu$ l.

Tab. 3.1 Složení reakční směsi

Master Mix	10 µl
Primer (10 pmol/µl)	2 µl
Vzorek DNA	2 µl
PCR H <sub>2</sub> O	Doplnit do objemu 20 µl

Tab. 3.2 Teplotní cyklus pro RAPD analýzu

Počet opakování	Teplota [°C]	Čas [min]
1	95	4:00
40	95	1:00
	38	1:30
	72	2:00
1	72	10:00

### 3.9.3 Amplifikace genů pro SSU rRNA trypanosomatid

Chemikálie:

Combi PPP Master Mix (Top-Bio, s.r.o.)

PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, s.r.o.)

Primery: Medlin A (5'→3': CTG GTT GAT CCT GCC AG)  
 Medlin B (5'→3': TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC)  
 S763 (5'→3': CAT ATG CTT GTT TCA AGG AC)  
 S762 (5'→3': GAC TTT TGC TTC CTC TAW TG)  
 SSU1-Rev (5'→3': CGW RAA TCA GGA AAG GAA CC)  
 SSU1 (5'→3': CCA AGG AAA GGA CTA ARW GC)

Vstupní DNA

U všech kultivovatelných izolátů byl amplifikován a sekvenován gen pro malou ribozomální podjednotku. Pro amplifikaci tohoto genu byly použity dvojice primerů Medlin A+B dle Medlin a kol. (1988) nebo S762+S763 dle Maslov a kol. (1996). Sekvenci pro SSU rRNA lze taktéž získat z environmentálních vzorků u nekultivovatelných kmenů. Ovšem musí se zahrnout fakt, že tyto vzorky obsahují kromě malého množství DNA parazita i DNA plošnice. K získání dostatečného množství produktu bylo zapotřebí využít vícecyklové PCR (amsterdam, seminested PCR). Do amplifikační směsi prvního cyklu byly přidány primery S762+S763, které vykazují větší specifitu pro gen SSU rRNA trypanosomatid než Medlin A+B. Druhý cyklus byl proveden taktéž pomocí primerů S762+S763, tzv. amsterdam PCR. Pokud výsledek odečtený na agarózovém gelu po horizontální elektroforéze byl negativní, byl zopakován druhý cyklus s využitím dvojice primerů SSU-1-Rev+S763 a SSU-1+S762, tzv. seminested. Tím byly získány dva kratší úseky genu pro SSU rRNA, po jejich osekvenování a spojení byla získána celá sekvence.

Tabulka 3.3 uvádí složení amplifikační směsi a tabulka 3.4 průběh cyklu v termocycleru.

Tab. 3.3 Složení amplifikační směsi

Master Mix	12,5 µl
Primery (Med A+B; S762+S763) (10 pmol/µl)	1 µl
Vzorek DNA *	1 µl
PCR H <sub>2</sub> O	doplnit do objemu 25 µl

\* DNA z buněk z kultury, environmentální vzorek, 1 µl směsi z prvního cyklu PCR

Tab. 3.4 Teplotní cyklus pro amplifikaci SSU rRNA

Počet opakování	Teplota [°C]	Čas [min]
1	94	5:00
40	94	1:00
	55	1:30
	72	1:30
1	72	5:00

### 3.9.4 Amplifikace genu pro gGAPDH

Chemikálie:

Combi PPP Master Mix (Top-Bio, s.r.o.)

PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, s.r.o.)

Primery:

G3F (5' → 3': TTY GCC GYA TYG GYC GCA TGG)

G4a (5' → 3': GTT YTG CAG SGT CGC CTT GG)

M200 (5' → 3': ATG GCT CCV VTC AAR GTW GGM AT)

M201 (5' → 3': TAK CCC CAC TCR TTR TCR TAC CA)

Y-F (5' → 3': aga gga tcc ATG GCT CCG MTC AAG GTT GGC)

Y-R (5' → 3': aga gga tcc TTA CAT CTT CGA GCT CGC GSS GTC)

Vstupní DNA

U kultivovatelných izolátů byl amplifikován a sekvenován gen pro glykosomální glyceraldehyd-3-fostát dehydrogenázu (gGAPDH). Pro amplifikaci genu byly použity dvojice primerů G3F+G4a dle Hamilton a kol. (2004), M200+M201 dle Yurchenko a kol. (2009) a Y-F+Y-R dle Yurchenko a kol. (2006a). Tabulka 3.5 uvádí složení amplifikační směsi a tabulka 3.6 průběh cyklu v termocycleru.

Tab. 3.5 Složení amplifikační směsi

Master Mix	12,5 µl
Primery (G3F+G4a; M200+M201; Y-R+Y-F) (10 pmol/µl)	1 µl
Vzorek DNA	1 µl
PCR H <sub>2</sub> O	Doplnit do objemu 25 µl

Tab. 3.6 Teplotní cyklus pro amplifikaci gGAPDH

Počet opakování	Teplota [°C]	Čas [min]
1	94	3:00
32	94	1:00
	55	0:30
	72	1:30
1	72	5:00

### 3.9.5 Amplifikace genu pro SL RNA

Chemikálie:

Combi PPP Mater Mix (Top-Bio, s.r.o.)

PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, s.r.o.)

Primery: ME1 (5' → 3': TTC TGT ACT TTA TTG GTA)

ME2 (5' → 3': CAA TAA AGT ACA GAA ACT G)

M167 (5' → 3': GGG AAG CTT CTG TAC TWT ATT GGT A)

M168 (5' → 3': GGG AAT TCA ATA AAG TAC AGA AAC TG)

Vstupní DNA

U kultivovatelných izolátů a u části environmentálních vzorků byl amplifikován gen pro „splice leader“ (SL RNA). Sekvence byla získána až po zaklonování do kompetenčních buněk *Escherichia coli*. Pro amplifikaci genu byly použity dvojice primerů ME1+ME2 dle Podlipaev a kol. (2004a) a M167+M168 dle Westenberger a kol. (2004). Tabulka 3.7 uvádí složení amplifikační směsi. V tabulkách 3.8 a 3.9 jsou uvedeny průběhy cyklů v termocycleru.

Tab. 3.7 Složení amplifikační směsi

Master Mix	12,5 µl
Primery (ME1+ME2; M167+M168) (10 pmol/µl)	1 µl
Vzorek DNA	1 µl
PCR H <sub>2</sub> O	Doplnit do objemu 25 µl

Tab. 3.8 Teplotní cyklus pro amplifikaci SL RNA u buněk získaných z kultury

Počet opakování	Teplota [°C]	Čas [min]
1	95	4:30
32	95	0:30
	42	1:00
	65	2:30
1	95	0:30
	50	1:00
	72	2:30
	50	1:00
	72	5:00



Tab. 3.9 Teplotní cyklus pro amplifikaci SL RNA u environmentálních vzorků

Počet opakování	Teplota [°C]	Čas [min]
1	94	4:00
4	94	0:30
	42	1:00
	65	2:30
45	94	0:30
	50	1:00
	72	2:30
1	50	1:00
1	72	10:00

### 3.9.6 Elektroforéza a izolace DNA z gelu

Chemikálie:

TAE pufr (AppliChem GmbH)  
 Agaróza (Invitrogen Ltd.)  
 SybrSafe DNA gel stain (Invitrogen Ltd.)  
 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas life science)  
 High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH)  
 Isopropanol (Sigma-Aldrich)  
 PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, s.r.o.)  
 Amplifikovaný produkt

Výsledek PCR reakce byl zobrazen pomocí horizontální elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Do agarózového gelu bylo přidáno interkalační barvivo SybrSafe, které umožnilo vizualizaci DNA pod UV nebo modrým světlem. Za účelem zjištění velikosti PCR produktu byl na gel společně se vzorky nanášen i GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus. Po dokončení elektroforézy byly pořízeny snímky gelů.

Po skončení elektroforézy byly z gelu vyříznuty sterilním skalpelem jednotlivé proužky amplifikované DNA. Tyto vzorky byly zváženy a poté z nich byla extrahována DNA dle návodu poskytnutém výrobcem (Roche) kitu High Pure PCR Product Purification Kit.

### 3.9.7 Klonování SL DNA a izolace plasmidů

Chemikálie:

pGEM® – T Easy Vector Systém (Promega)  
 Luria-Bertani broth „LB“ (Sigma)  
 Bacto™ Agar (Chemos)  
 Isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) (Fermentas life science)  
 Bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid (X-Gal) (Fermentas life science)  
 Ampicilin (Labmark)  
 Pure Yield™ Plasmid Miniprep Systém (Promega)  
 Kompetenční buňky TOP10 (Invitrogen)  
 MgCl<sub>2</sub>  
 CaCl<sub>2</sub>  
 glycerol  
 Vstupní DNA

U kultivovatelných kmenů i u environmentálních vzorků byla provedena amplifikace genu pro SL RNA pomocí specifických primerů. Poté byly vzorky nanесeny na elektroforézu, jednotlivé proužky vyříznuty a DNA byla izolována z gelu. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru (NanoDrop ND-1000). Ke klonování byly používány plasmidy pGEM otevřené restriktázou EcoRV (GAT/ATC) s přidanými 3' terminálními thymidinovými přesahy, které zvyšují účinnost ligace PCR produktu (Taq polymeráza tvoří adenosinové lepidivé konce) a brání recirkularizaci vektoru. Ligační směs byla připravena v přesném pořadí dle tabulky 3.10 a přes noc uložena do 4 °C.

Tab. 3.10 Složení ligační směsi

Ligační pufr	5 µl
Plasmidy pGEM	1 µl
PCR produkt (5 – 50 ng/µl)	3 µl
T4 ligáza	1 µl

Ligační směs byla přidána ke 200 µl kompetenčních buněk *Escherichia coli* TOP10 rozmražených na ledu. Buňky s přidanými plasmidy byly poté ponechány 20 minut na ledu. Plasmidy byly vneseny do buněk pomocí tepelného šoku při 42 °C po dobu 45 sekund, pak byly ponechány 2 minuty na ledu. K buňkám bylo přidáno LB médium do celkového objemu 1 ml. Mikrozkuřavka byla třepána 1,5 hodiny při 37 °C a 220 rpm. Narostlé buňky (150 – 180 µl) byly vysety na agarovou plotnu předem potřenou směsí tvořenou ze 100 µl IPTG, 20 µl xGalaktózy a 25 µl ampicilinu (100 mg/ml). Plotny byly uloženy do termostatu, kde byly ponechány 12 hodin. Z každé plotny bylo vypíchnuto 5 bílých kolonií, které byly resuspendovány v 10 µl vody v mikrozkuřavkách. Následně byly vloženy do termocyklieru, kde došlo ke zničení buněčných stěn a uvolnění DNA při programu LIKV viz tabulka 3.11. Ze vzniklého lyzátu buněk byla připravena PCR reakce pro amplifikaci genu pro SL RNA (tabulka 3.12) a ověření velikosti tohoto produktu s výchozím úsekem.

Tab. 3.11 Teplotní cyklus LIKV

Teplota [°C]	Čas [min]
96	5:00
50	1:50
96	1:50
45	1:00
96	1:00
40	1:00

Tab. 3.12 Složení reakční směsi

Master mix	9 $\mu$ l
Lyzát	10 $\mu$ l
Primer (ME1+ME2; M167+M168) (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Pomocí elektroforézy na agarózovém gelu byla ověřena velikost amplifikovaných produktů PCR. Podle těchto výsledků byly vybrány dva klony s námi vneseným fragmentem DNA a vyočkovány do 15 ml falcony s 4 ml LB média a 4  $\mu$ l ampicilinu (100 mg/ml). Tyto kultury byly ponechány přes noc na třepačce při 37 °C a 220 rpm. K izolaci plasmidů z narostlých buněk byl použit kit Pure Yield™ Plasmid Miniprep System. Poté byly plasmidy odeslány k sekvenaci pomocí primerů SP6 a T7 do Laboratoře sekvenace DNA PřF UK Praha.

### **Příprava LB agarových ploten**

Na přípravu LB agaru bylo použito 10 g sypkého LB média a 7,5 g BactoAgaru. Tato směs byla doplněna 500 ml destilované vody a klávována 25 minut při 120 °C. Ve sterilním boxu bylo do sterilních Petriho misek rozplněno ještě horké médium. Plotny byly poté ponechány s odklopeným víčkem po dobu 15 minut, aby agar utuhl. Takto připravené agarové plotny byly skladovány při 4 °C dnem vzhůru a proti vyschnutí byly obaleny parafilmem.

### **Příprava kompetenčních buněk**

První den bylo třeba vyočkovat část originálních kompetenčních buněk na čistou LB agarovou plotnu pomocí sterilní bakteriální kličky. Plotna se následně uložila přes noc do termostatu (37 °C). Druhý den se vybrala jedna kolonie, která se sterilně přenesla do 15 ml falcony s 5 ml LB média a nechala se přes noc třepat (37 °C, 220 rpm). Takto připravené inokulum se přelilo do Erlenmeyerovy baňky s 500 ml LB média a třepalo se 4 až 5 hodin do optické denzity  $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ . Narostlá kultura kompetenčních buněk se po malých částech (50 ml) stáčela (10 min, 5 000 rpm) do té doby, dokud nebyl veškerý sediment v jedné 50 ml falkoně. Následně se sediment rozsuspendoval v 50 ml ledového roztoku 0,1 M  $MgCl_2$ . Opět se buňky stočily (10 min, 2 000 rpm) a rozsuspendovaly v 50 ml ledového roztoku  $CaCl_2$ . Po tomto kroku se buňky ponechaly 20 minut na ledu. Po uplynutí této doby se stočily (10 min, 2 000 rpm) a pelet se rozsuspendoval v 20 ml ledového roztoku 0,1 M  $CaCl_2$  s přidaným glycerolem (14 % z celkového objemu). Takto připravené kompetenční buňky se rozplňovaly po 200  $\mu$ l do 1,5 ml plastových mikrozkupek a ukládaly do tekutého dusíku. Před použitím se uchovávaly v -70 °C.

### 3.9.8 Sekvenační reakce

Chemikálie:

Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1 (Applied Biosystems)  
 Primery  
 PCR H<sub>2</sub>O (Top Bio, s.r.o.)  
 96% a 70% ethanol (AppliChem GmbH, BioChemica)  
 3M octan sodný (NaAc)  
 Vstupní DNA

Vstupní DNA byla nejdříve vyizolována z gelu po elektroforéze. Složení sekvenační reakce je uvedeno v tabulce 3.13, přehled využívaných primerů v tabulce 3.14 a průběh teplotního cyklu je zaznamenán v tabulce 3.15.

Tab. 3.13 Složení směsi čtvrtinové sekvenační reakce

Terminator Ready Reaction Mix	2 µl
Sekvenační pufr	4 µl
Primer (3,2 pmol/µl)	1 µl
Vzorek DNA	1 µl
PCR H <sub>2</sub> O	Doplnit do objemu 20 µl

Tab. 3.14 Přehled primerů používaných k sekvenaci

Gen	Primer	Orientace primeru	Sekvence primeru 5'→3'
SSU rRNA	MedlinA	F	CTG GTT GAT CCT GCC AG
	MedlinB	R	TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC
	S763	F	CAT ATG CTT GTT TCA AGG AC
	S762	R	GAC TTT TGC TTC CTC TAW TG
	F-577	F	GCC AGC ACC CGC GGT
	R-577	R	ACC GCG GGT GCT GGC
	F-1510	F	CAG GTC TGT GAY GCT G
	R-1510	R	CAG CRT CAC AGA CCT G
	SSU1	F	GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG
SSU1-Rev	R	CGW RAA TCA GGA AAG GAA CC	
gGAPDH	G3F	F	TTY GCC GYA TYG GYC GCA TGG
	G4a	R	GTT YTG CAG SGT CGC CTT GG
	G7F	F	YAT YCC CAG CAC VAC YGG BGC
	G7R	R	CSC CRG TBG TGC TBG GRA TG
	M200	F	ATG GCT CCV VTC AAR GTW GGM AT
	M201	R	TAK CCC CAC TCR TTR TCR TAC CA
	Y-F	F	aga gga tcc ATG GCT CCG MTC AAG GTT GGC
	Y-R	R	aga gga tcc TTA CAT CTT CGA GCT CGC GSS GTC
SL RNA	ME1	F	TTC TGT ACT TTA TTG GTA
	ME2	R	CAA TAA AGT ACA GAA ACT G
	M167	F	GGG AAG CTT CTG TAC TWT ATT GGT A
	M168	R	GGG AAT TCA ATA AAG TAC AGA AAC TG
pGEM	SP6	F	TAT TTA GGT GAC ACT ATA G
	T7	R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Tab. 3.15 *Teplotní cyklus pro sekvenační reakci*

Počet opakování	Teplota (°C)	Čas (min)
1	96	0:30
25	96	0:10
	50	0:10
	60	4:00

Po ukončení teplotního cyklu bylo k sekvenační reakci přidáno 50 µl 96% ethanolu a 2 µl 3M octanu sodného. Ethanol společně s octanem sodným směs DNA přesrážel, a tím se odstranily zbylé dideoxynukleotidy. Směs v mikrozkuhavce byla ponechána při pokojové teplotě 15 minut. Dále byla centrifugována 15 minut při 12 000 rpm. Z mikrozkuhavky byl opatrně odebrán supernatant a k precipitované DNA bylo přidáno 180 µl 70% ethanolu pro promytí a odstranění zbylých solí. Sekvenační reakce byla poté centrifugována 5 minut při 12 000 rpm. Opět byl z mikrozkuhavky odebrán supernatant a pelet tvořený DNA byl sušen při pokojové teplotě zhruba 20 minut. Další sekvenační kroky zahrnující analýzu sekvenátorem 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) byly provedeny v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK v Praze.

### 3.9.9 Vyhodnocení sekvencí a tvorba aligmentů

Použité programy:

Seqman, DNASTAR Inc.

EditSeq, DNASTAR Inc.

ClustalX 1.81

BioEdit 5.0.0.1

Blastn na serveru [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Notepad

Výsledek sekvenační reakce ve formě fluorescenčních křivek byl upraven do výsledné podoby v programu Seqman. Sekvence byla vizuálně zkontrolována, zda neobsahuje chyby a následně z ní byly odstraněny sekvence primerů, načež byla sekvence uložena ve formátu FASTA (program Notepad) pro další použití.

Dostupné sekvence SSU rRNA a gGAPDH kinetoplastid byly získány na serveru NCBI v databázi GenBank (tabulka 3.16). Dataset pro SL RNA byl poskytnut D. A. Maslovem. K tvorbě finálního aligmentu z publikovaných i našich sekvencí byl použit program ClustalX (parametry: gap opening 15, gap extension 10), následně byl alignment ručně poupraven v programu BioEdit. Nakonec byly odstraněny konce a hypervariabilní úseky a chybějící místa byla označena symbolem „N“.

Podobnost sekvencí (P-index) u genu SL RNA byla vypočítána v programu BioEdit. Odchyly do 10 % byly brány jako vnitrodruhová variabilita (Westenberger a kol., 2004).

Tab. 3.16 Přehled použitých sekvencí SSU rRNA a gGAPDH získaných z databáze GenBank

Druh	SSU	gGAPDH	Hostitel	Skupina
<i>Blastocrithidia culicis</i> (1) ATCC30268	L29266			
<i>Blastocrithidia culicis</i> (2) ATCC30268	U05679			
<i>Blastocrithidia culicis</i> (3) ATCC30268	L29265			
<i>Blastocrithidia culicis</i> ATCC30268 (1)		EU079136	<i>Aedes triseriatus</i> , <i>A. vexans</i> , <i>Anopheles maculipennis</i> , <i>A.</i> <i>umbrosus</i> , <i>Culex pipiens</i> , <i>Mansonia richardii</i> ; <i>Triatoma</i> <i>infestans</i>	Diptera; Hemiptera
<i>Blastocrithidia culicis</i> ATCC30268 (2)		EU079137	<i>Aedes vexans</i> ; <i>Triatoma</i> <i>infestans</i>	Diptera; Hemiptera
<i>Blastocrithidia gerricola</i>	AF153036	AF322391	<i>Gerris lacustris</i>	Hemiptera
<i>Blastocrithidia largi</i>	FJ968531	FJ968528	<i>Largus cinctus</i>	Hemiptera
<i>Blastocrithidia miridarum</i> ZM (1)	EU079128	EU084896	<i>Lygocoris lucorum</i> , <i>Adelphocoris quadripunctatus</i> , <i>Deraeocoris ruber</i> , <i>Notostira</i> <i>elongata</i> , <i>Stenodema</i> <i>calcaratum</i> , <i>Leptopectera</i> <i>dolobrata</i>	Hemiptera
<i>Blastocrithidia miridarum</i> ZM (2)		EU084897	<i>Leptopectera dolobrata</i>	Hemiptera
<i>Blastocrithidia triatoma</i>	AF153037		<i>Triatoma infestans</i>	Hemiptera
<i>Bodo saltans</i>	AY490224			
<i>Bodo saltans</i>		DQ915847		
<i>Bodo saltans</i> K (1)		EU084900		
<i>Bodo saltans</i> K (2)		EU084901		
<i>Bodo saltans</i> K (3)		EU084902		
<i>Bodo uncinatus</i>	AF208884			
<i>Crithidia abscondita</i> 127AL	EU079126	EU076606	<i>Largus</i> sp.	Hemiptera
<i>Crithidia deanei</i>		EF546792		
<i>Crithidia deanei</i> ATCC30255 (1)	EU079129		<i>Zelus leucogrammus</i>	Hemiptera
<i>Crithidia deanei</i> ATCC30969 (2)	EU099538	EU079132		
<i>Crithidia deanei</i> uncertain1		ANO		
<i>Crithidia fasciculata</i>	Y00055	AF047493	<i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> , <i>Culex</i> , <i>Mansonia</i>	Diptera
<i>Crithidia insperata</i> 119YS	EU079125	EU076605	<i>Leptopetalops</i> sp.	Hemiptera
<i>Crithidia luciliae</i>		AF053740		
<i>Crithidia oncopelti</i> (1)	AF038025			
<i>Crithidia oncopelti</i> (2)	L29264		<i>Lygaeus kalmii</i> , <i>Drosophila</i> <i>viridis</i> , <i>Tenebrio molitor</i> , <i>Achaeta domestica</i>	
<i>Crithidia oncopelti</i> ATCC12982 (4)		EU079134	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Hemiptera
<i>Crithidia oncopelti</i> ATCC12982 (5)		EU079135	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Hemiptera
<i>Crithidia oncopelti</i> ATCC30264 (3)	EU099539	EU079133	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Hemiptera
<i>Crithidia oncopelti</i> uncertain1		ANO		
<i>Crithidia permixta</i> 128SI	EU079127	EU076607	<i>Mirini</i>	Hemiptera
<i>Endotrypanum monterogeii</i>	X53911			
<i>Herpetomonas</i> cf. <i>roitmani</i> Er	AF267738			
<i>Herpetomonas mariadeanei</i>	U01013		<i>Muscina stabulans</i> , <i>Nabis</i> <i>flavomarginatus</i>	Diptera; Hemiptera

Druh	SSU	gGAPDH	Hostitel	Skupina
<i>Herpetomonas megaseliae</i>	U01014	DQ092547	Megaselia scalaris	Diptera
<i>Herpetomonas muscarum muscarum</i>	U01015	DQ092548	Musca domestica	Diptera
<i>Herpetomonas muscarum muscarum</i> L188	L18872		Musca domestica	Diptera
<i>Herpetomonas roitmani</i> TCC080	AF038023	EU079130		
<i>Herpetomonas samuelpesoai</i> ATCC30252	U01016	AF047494	Zelus leucogrammus	Hemiptera
<i>Herpetomonas</i> sp. TCC263	AF038024	EU079131		Diptera
<i>Herpetomonas trimorpha</i> CER9	EU179326	FJ850241		
<i>Herpetomonas ztiplika</i> CER1	AF416560	FJ850242	Culicoides cubitalis, C. kibunensis	Diptera
CH148 Ch2 (China) Env	GU059561		Rhynocoris sp.	Hemiptera
CH231 Ch15 (China) Env	GU059562		Aquarius p. paludum	Hemiptera
CH300 Ch14 (China) Env	GU059563		Leptocoris lepida	Hemiptera
CH322 Ch5 (China) Env <b>část</b>	GU059564		Gyndes sp.	Hemiptera
CH332 Ch13 (China) Env <b>část</b>	GU059565		Cletus bipunctatus	Hemiptera
CH334 Ch3 (China) Env	GU059566		Iphita limbata	Hemiptera
CH339 Ch1 (China) Env	GU059567		Eysarcoris guttigerus	Hemiptera
CH380 Ch8 (China) Env	GU059568		Dieuches pamela	Hemiptera
CH391 Ch10 (China) Env	GU059569		Melamphaus faber	Hemiptera
CH392 Ch4 (China) Env	GU059570		Melamphaus faber	Hemiptera
CH404 Ch15 (China) Env	GU059572		Aquarius p. paludum	Hemiptera
CH50 Ch6 (China) Env	GU059558		Sarju taungyiana, Tapirocoris cf. limbatus	Hemiptera
CH53 Ch7 (China) Env	GU059559		Ochrochira sp.	Hemiptera
CH91 Ch9 (China) Env	GU059560		Gerris (Macrogerris) sp.	Hemiptera
<i>Leishmania donovani</i>	X07773		Homo sapiens	
<i>Leishmania infantum</i>				
<i>Leishmania major</i>	X53915	AF047497	Arvicantis, Homo sapiens, Psammomys sp.	
<i>Leishmania mexicana</i>	M81422	X65226		
<i>Leishmania tarentolae</i>	X53916	DQ092549	Tarentola mauritanica	
<i>Leptomonas acus</i>	DQ910923	DQ910926	Eccritotarsina	Hemiptera
<i>Leptomonas barvae</i>	FJ968532	FJ968529	Collaria oleosa	Hemiptera
<i>Leptomonas bifurcata</i>	DQ910925	DQ910928	Pachypoda sp.	Hemiptera
<i>Leptomonas</i> cf. <i>lactosovorans</i> 37EC	EU079122	EU076602	Pachygrontha barberi	Hemiptera
<i>Leptomonas</i> cf. <i>podlipaevi</i> 59LI	EU079124	EU076604	Jadera aeola	Hemiptera
<i>Leptomonas collosoma</i>	AF153038		Gerris dissortis, G. remigis	Hemiptera
<i>Leptomonas collosoma</i> clone 1		EU084898	Gerris sp.	Hemiptera
<i>Leptomonas collosoma</i> clone 2		EU084899	Gerris sp.	Hemiptera
<i>Leptomonas costaricensis</i>	DQ383648	DQ383650	Ricolla simillima	Hemiptera
<i>Leptomonas jaderae</i> 34EC	EU079123	EU076603	Jadera obscura	Hemiptera
<i>Leptomonas lactosovorans</i>		AF053741	Zelurus martinsi	Hemiptera
<i>Leptomonas neopamerae</i>	DQ910924	DQ910927	Neopamera sp.	Hemiptera
<i>Leptomonas peterhoffi</i>	AF153039	AF322390	Nabucula flavomarginata	Hemiptera
<i>Leptomonas podlipaevi</i>	DQ383649	DQ019001	Boisea rubrolineata	Hemiptera
<i>Leptomonas pyrrhocoris</i>		AY029072	Pyrrhocoris apterus	Hemiptera
<i>Leptomonas seymouri</i>	AF153040	AF047495	Dysdercus suturellus	Hemiptera
<i>Leptomonas seymouri</i> (2)		AF053738		

Druh	SSU	gGAPDH	Hostitel	Skupina
<i>Leptomonas</i> sp. Cfm	AF153041	AF320820	<i>Nabacula flavomarginata</i>	Hemiptera
<i>Leptomonas</i> sp. F2		AF375664	<i>Nabacula flavomarginata</i>	Hemiptera
<i>Leptomonas</i> sp. F6	AF153042		<i>Nabacula flavomarginata</i>	Hemiptera
<i>Leptomonas</i> sp. Nfm	AF153043	AF339451	<i>Nabacula flavomarginata</i>	Hemiptera
<i>Leptomonas</i> sp. P		EF546793	<i>Panorpa communis</i>	Mecoptera
<i>Leptomonas tarcoles</i>	EF546786	EF546787	<i>Prepops</i> sp.	Hemiptera
<i>Leptomonas</i> X53914	X53914			
<i>Phytomonas serpens</i> 1G (1)		EU084892	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae
<i>Phytomonas serpens</i> 1G (2)		EU084893	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae
<i>Phytomonas serpens</i> 1G (3)		EU084894	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae
<i>Phytomonas serpens</i> 9T	AF016320			
<i>Phytomonas</i> sp.		AF047496		
<i>Phytomonas</i> sp. E.hi.Se	L35077			
<i>Phytomonas</i> sp. EM1		EU084895		
<i>Phytomonas</i> sp. HART1	L35076			
<i>Phytomonas</i> sp. TCC231	AF016321			
<i>Sergeia podlipaevi</i>	DQ394362	DQ394365	<i>Culicoides festivipennis</i>	Diptera
<i>Trypanosoma avium</i>		AJ620262	(ptáci)	
<i>Trypanosoma avium</i>	U39578		(ptáci)	
<i>Trypanosoma avium currawong</i>		AJ620264		
<i>Trypanosoma avium chaffinch</i>		AJ620263		
<i>Trypanosoma bennetti</i>	AJ223562	FJ649486		
<i>Trypanosoma blanchardi</i>	AY491764		<i>Eliomys quercinus</i>	
<i>Trypanosoma conorhini</i>		AJ620267	<i>Rattus rattus</i>	
<i>Trypanosoma corvi</i>	AY461665	FJ649496	<i>Corvus splendens</i>	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	AF239980	X52898	(savci)	
<i>Trypanosoma culicis</i> CUL1	AF416561	ANO	<i>Culex pipiens</i>	Diptera
<i>Trypanosoma granulosum</i>		AJ620247	<i>Anguilla anguilla</i>	Teleostei
<i>Trypanosoma grayi</i>		AJ620258		
<i>Trypanosoma grayi</i>	AJ223565	AJ620258		
<i>Trypanosoma grosi</i>	AB175623		<i>Apodemus</i> spp.	
<i>Trypanosoma kuseli</i>	AB175626		<i>Pteromys volans</i>	
<i>Trypanosoma lewisi</i>	AJ223566		<i>Rattus</i>	
<i>Trypanosoma mega</i>	AJ223567	AJ620253	Bufo, Rana	
<i>Trypanosoma microti</i>		AJ620273	<i>Microtus agrestis</i>	Rodentia
<i>Trypanosoma musculi</i>	AJ223568		<i>Mus musculus</i>	
<i>Trypanosoma otospermophili</i>	AB190228		<i>Spermophilus columbianus</i>	
<i>Trypanosoma rabinowitschae</i>	AY491765		<i>Cricetus cricetus</i>	
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	AJ009161	AJ620256	(žáby),	
Trypanosomatid Eva	AF071866		Phlebotominae	
Trypanosomatid G755	U59491			Diptera
<i>Wallaceina brevicula</i>	AF153045	AF316620	<i>Nabis brevis</i>	Hemiptera
<i>Wallaceina inconstans</i>	AF153044	EU076608	<i>Calocoris sexguttatus</i>	Hemiptera



### 3.9.10 Tvorba fylogenetických stromů

Použité programy:

PAUP \* 4.0b10

PhyML win32

Modeltest 3.0

Mr. Bayes 3.1.2

TreeView 3.0.111.0

CorelDraw X3, 13, Corel corp.

Fylogenetické stromy pro SSU rRNA, gGAPDH a SL RNA byly zkonstruovány pomocí metod maximální věrohodnosti (ML) v programu PhyML, bayesovské metody (MrB) v programu MrBayes a metodou neighbor joining (NJ) v programu PAUP. Parametry pro ML byly získány pomocí programu Modeltest (TrNef + I +  $\Gamma$ ). Statistická podpora topologie u jednotlivých větví byla stanovena pomocí bootstrapu 1000 (ML a NJ) replikátů. V programu MrBayes bylo nastaveno 5 milionů generací se čtyřmi řetězci za použití evolučního modelu GTR+I+ $\Gamma$  a covarion model, který povoluje různé mutační rychlosti (Vacmodel=4by4, nst=6, rates=invgamma, covarion=yes).

Fylogenetické stromy byly zobrazeny pomocí programu TreeView a do koncové podoby byly upraveny programem CorelDraw.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Studium jednohostitelských trypanosomatid ploštic v České republice

#### 4.1.1 Vyšetření odchycených ploštic

U ploštic odchycených na území České republiky byla studována infekce trypanosomatidy. Odchyty probíhaly v letech 2007 až 2009 převážně na lokalitách v blízkosti obce Předboř a v okolí Turnova. Dále byly získány ploštice i z dalších lokalit (Ruda – Veselí n. L., Praha – Kunratice). Dlouhodobý odchyt na jedné lokalitě měl za cíl odhalení ekologických vztahů mezi hostiteli a jejich parazity. Celkem bylo vypitváno 1210 jedinců, přičemž nákaza trypanosomatidy byla pozorována v 77 případech (6% prevalence). Byly vyšetřeny ploštice náležící do 110 druhů<sup>2</sup>, 78 rodů z 27 čeledí (tabulka 4.1). V případě 57 ploštic z čeledi Miridae nebylo možné zařazení ani do rodu z důvodu zničení preparátu, ale s největší pravděpodobností se jednalo o již odchycené druhy z lokality poblíž Předboře. Největší podíl mezi vypitvanými plošticemi zaujímaly druhy z čeledi Miridae (442 jedinců), Nabidae (213 jedinců) a Pentatomidae (133 jedinců). Největší prevalence nákazy jednohostitelskými trypanosomatidy byla pozorována u čeledi Nepidae (100 %), Pyrrhocoridae a Oxycarenidae (27 %), Lygaeidae (13 %), Pentatomidae (7 %) a Nabidae (7 %). Mezi 5 – 6 % se pohybovala prevalence u čeledi Gerridae, Reduviidae, Rhyparochromidae a Scutelleridae. U čeledi Coreidae, Miridae a Rhopalidae dosáhla prevalence pouhých 3 %. Neodhalená nákaza jednohostitelskými trypanosomatidy u některých z čeledí mohla být také ovlivněna počtem vypitvaných kusů. Na obrázku 4.1 je znázorněna závislost odhalení infekce na počtu vypitvaných kusů.

Tab. 4.1 Přehled vypitvaných ploštic odchycených na území ČR v letech 2007 až 2009

Čeď	Celkem <sup>1</sup>	Rod	Celkem <sup>1</sup>	Druh <sup>4</sup>	M <sup>2</sup>	F <sup>2</sup>	N <sup>2</sup>	Celkem <sup>1</sup>	Vzorek	Typ. <sup>3</sup> jednot.
Acanthosomatidae	4/0	<i>Cyphostethus</i>	1/0	<i>Cyphostethus tristriatus</i>	0	1/0	0	1/0		
		<i>Elasmucha</i>	3/0	<i>Elasmucha grisea</i> *	0	3/0	0	3/0		
Alydidae	6/0	<i>Alydus</i>	6/0	<i>Alydus calcaratus</i>	4/0	1/0	1/0	6/0		
Anthocoridae	8/0	<i>Acompocoris</i>	2/0	<i>Acompocoris</i> sp. *	2/0	0	0	2/0		
		<i>Anthocoris</i>	6/0	<i>Anthocoris nemoralis</i> *	0	1/0	0	1/0		
				<i>Anthocoris nemorum</i> *	2/0	3/0	0	5/0		
Artheneidae	3/0	<i>Chilacis</i>	3/0	<i>Chilacis typhae</i>	1/0	2/0	0	3/0		
Berytidae	4/0	<i>Berytinus</i>	4/0	<i>Berytinus minor</i> *	1/0	3/0	0	4/0		
Blissidae	4/0	<i>Ischnodemus</i>	4/0	<i>Ischnodemus sabuleti</i> *	1/0	3/0	0	4/0		
Coreidae	63/2	<i>Coreus</i>	61/2	<i>Coreus marginatus</i>	30/1	27/0	4/1	61/2	P9; P36	11
		<i>Nemocoris</i>	2/0	<i>Nemocoris fallenii</i>	1/0	1/0	0	2/0		
Corixidae	2/0	<i>Sigara</i>	2/0	<i>Sigara falleni</i>	1/0	1/0	0	2/0		
Cydniidae	10/0	<i>Tritomegas</i>	10/0	<i>Tritomegas sexmaculatus</i>	2/0	2/0	6/0	10/0		

<sup>2</sup> Pro představu bylo v ČR doposud zjištěno 863 druhů ploštic (Kment, ústní sdělení).

Čeleď	Celkem <sup>1</sup>	Rod	Celkem <sup>1</sup>	Druh	M <sup>2</sup>	F <sup>2</sup>	N <sup>2</sup>	Celkem <sup>1</sup>	Vzorek	Typ. jednot.
Gerridae	51/3	Aquarius	28/0	<i>Aquarius najas</i>	17/0	6/0	4/0	27/0		
				<i>Aquarius paludum</i>	0	1/0	0	1/0		
		Gerris	23/3	<i>Gerris gibbifer</i> *	1/0	1/0	0	2/1	P1	18
				<i>Gerris lacustris</i>	5/0	12/0	0	17/0		
				<i>Gerris odontogaster</i>	1/0	3/1	0	4/2	P31; P32	9
Hydrometridae	1/0	<i>Hydrometra</i>	1/0	<i>Hydrometra stagnorum</i>	1/0	0	0	1/0		
Lygaeidae	38/5	<i>Kleidocerys</i>	36/5	<i>Kleidocerys resedae</i> *	20/4	16/1	0	36/5	P50 až P54	7, 8
		<i>Lygaeus</i>	1/0	<i>Lygaeus equestris</i>	0	1/0	0	1/0		
		<i>Orsillus</i>	1/0	<i>Orsillus depressus</i>	0	1/0	0	1/0		
Miridae	442/14	<i>Adelphocoris</i>	13/1	<i>Adelphocoris quadripunctatus</i> *	0	2/0	0	2/1	P39	4
				<i>Adelphocoris seticornis</i> *	4/0	7/0	0	11/0		
		<i>Apolygus</i>	5/1	<i>Apolygus lucorum</i> *	3/1	2/0	0	5/1	P11	4
		<i>Calocoris</i>	15/2	<i>Calocoris affinis</i> *	10/1	5/1	0	15/2	P24; P30	
		<i>Capsus</i>	6/1	<i>Capsus ater</i> *	6/1	0	0	6/1	P26	
		<i>Closterotomus</i>	13/2	<i>Closterotomus norvegicus</i> *	4/0	9/2	0	13/2	P7; P10	4
		<i>Deraeocoris</i>	26/0	<i>Deraeocoris lutescens</i> *	15/0	6/0	0	21/0		
				<i>Deraeocoris ruber</i> *	3/0	2/0	0	5/0		
		<i>Dicyphus</i>	2/0	<i>Dicyphus errans</i> *	1/0	1/0	0	2/0		
		<i>Halticus</i>	1/0	<i>Halticus apterus</i> *	0	1/0	0	1/0		
		<i>Heterotoma</i>	1/0	<i>Heterotoma planicornis</i>	1/0	0	0	1/0		
		<i>Charagochilus</i>	4/0	<i>Charagochilus gyllenhalii</i>	2/0	2/0	0	4/0		
		<i>Leptopterna</i>	45/1	<i>Leptopterna dolabrata</i> *	8/0	37/1	0	45/1	P25	?
		<i>Liocoris</i>	12/1	<i>Liocoris tripustulatus</i> *	7/0	5/1	0	12/1	P27	4
		<i>Lygocoris</i>	2/0	<i>Lygocoris pabulinus</i> *	0	2/0	0	2/0		
		<i>Lygus</i>	108/2	<i>Lygus pratensis</i> *	9/0	27/0	0	36/0		
				<i>Lygus rugulipennis</i> *	37/1	31/1	0	68/2	P6; P20	4
				<i>Lygus wagneri</i> *	3/0	1/0	0	4/0		
		<i>Megaloceroea</i>	32/1	<i>Megaloceroea recticornis</i> *	7/0	25/1	0	32/1	P28	15
		<i>Notostira</i>	2/0	<i>Notostira erratica</i> *	0	2/0	0	2/0		
		<i>Orthops</i>	35/0	<i>Orthops basalis</i> *	6/0	6/0	0	12/0		
				<i>Orthops campestris</i> *	1/0	2/0	0	3/0		
				<i>Orthops kalmii</i> *	15/0	4/0	0	19/0		
				<i>Orthops sp.</i> *	0	1/0	0	1/0		
		<i>Pantilius</i>	1/0	<i>Pantilius tunicatus</i>	0	1/0	0	1/0		
		<i>Plagiognathus</i>	6/0	<i>Plagiognathus arbustorum</i> *	3/0	1/0	0	4/0		
				<i>Plagiognathus chrysanthemi</i> *	1/0	1/0	0	2/0		
<i>Polymerus</i>	1/0	<i>Polymerus nigrita</i> *	0	1/4	0	1/0				
<i>Stenodema</i>	16/0	<i>Stenodema calcarata</i> *	1/0	5/0	0	6/0				
		<i>Stenodema laevigata</i>	6/0	4/0	0	10/0				
<i>Stenotus</i>	18/2	<i>Stenotus binotatus</i> *	4/1	14/1	0	18/2	P3; P29	4, 10, 13, 15		
<i>Trigonotylus</i>	20/0	<i>Trigonotylus caelestialium</i> *	5/0	15/0	0	20/0				
	58/0	nedeterminováno	11/0	11/0	2/0	58/0				
Nabidae	213/15	<i>Himacerus</i>	45/0	<i>Himacerus apterus</i> *	1/0	1/0	7/0	9/0		
				<i>Himacerus mirmicoides</i> *	5/0	11/0	20/0	36/0		
		<i>Nabis</i>	168/15	<i>Nabis brevis</i> *	16/1	20/6	0	36/7	P5; P16 až P19; P22; P38	14, 15, 16, 18, 22, 23
				<i>Nabis ferus</i> *	0	1/0	0	1/0		
				<i>Nabis limbatus</i> *	2/0	10/1	0	12/1	P12	19
				<i>Nabis pseudoferus</i> *	29/2	31/1	0	60/3	P8; P13; P21	16, 18, 22
				<i>Nabis punctatus</i>	2/0	1/0	0	3/0		
				<i>Nabis rugosus</i> *	14/1	16/2	0	30/3	P14; P15; P55	15, 19
<i>Nabis sp.</i> *	7/0	12/0	7/1	26/1	P35	?				
Naucoridae	16/0	<i>Ilyocoris</i>	16/0	<i>Ilyocoris cimicoides</i>	6/0	10/0	0	16/0		

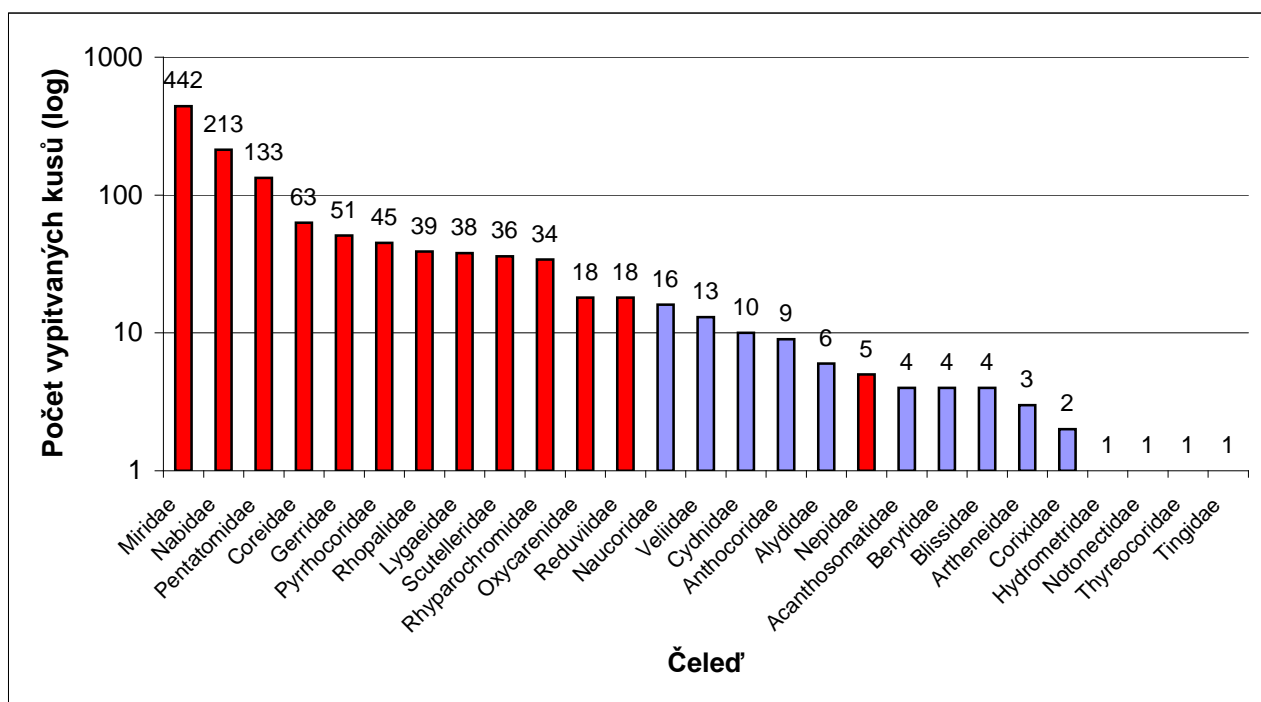
Čeleď	Celkem <sup>1</sup>	Rod	Celkem <sup>1</sup>	Druh	M <sup>2</sup>	F <sup>2</sup>	N <sup>2</sup>	Celkem <sup>1</sup>	Vzorek	Typ. jednot.
Nepidae	5/5	<i>Nepa</i>	5/5	<i>Nepa cinerea</i>	5/5	0	0	5/5	P42 až P46	20
Notonectidae	1/0	<i>Notonecta</i>	1/0	<i>Notonecta viridis</i>	0	1/0	0	1/0		
Oxycarenidae	18/5	<i>Oxycarenum</i>	18/5	<i>Oxycarenum lavaterae</i>	7/1	11/4	0	18/5	P65 až P69	1, 5
Pentatomidae	133/10	<i>Aelia</i>	6/0	<i>Aelia acuminata</i> *	4/0	2/0	0	6/0		
		<i>Arma</i>	3/1	<i>Arma custos</i> *	0	3/1	0	3/1	P71	12
		<i>Carpocoris</i>	4/0	<i>Carpocoris melanocerus</i> *	1/0	0	0	1/0		
				<i>Carpocoris purpureipennis</i> *	2/0	1/0	0	3/0		
		<i>Dolycoris</i>	19/4	<i>Dolycoris baccarum</i> *	9/0	7/4	0	19/4	P2; P4; P48; P49	1
		<i>Eurydema</i>	12/1	<i>Eurydema dominulus</i>	3/1	2/0	0	5/1	P58	1
				<i>Eurydema oleracea</i> *	4/0	3/0	0	7/0		
		<i>Eysarcoris</i>	8/1	<i>Eysarcoris aeneus</i>	3/1	0	0	3/1	P57	1
				<i>Eysarcoris venustissimus</i>	3/1	2/0	0	5/0		
		<i>Graphosoma</i>	18/0	<i>Graphosoma lineatum</i> *	10/0	5/0	0	18/0		
		<i>Holcostethus</i>	1/0	<i>Holcostethus</i> sp.	0	1/0	0	1/0		
		<i>Palomena</i>	42/1	<i>Palomena prasina</i> *	15/0	23/1	0	38/1	P40	6
				<i>Palomena</i> sp. *	0	0	4/0	4/0		
		<i>Pentatoma</i>	11/1	<i>Pentatoma rufipes</i> *	4/1	7/0	0	11/1	P56	6
<i>Picromerus</i>	5/1	<i>Picromerus bidens</i>	0	5/1	0	5/1	P47	17, 24		
<i>Piezodorus</i>	1/0	<i>Piezodorus lituratus</i>	0	1/0	0	1/0				
<i>Rhaphigaster</i>	2/0	<i>Rhaphigaster nebulosa</i> *	2/0	0	0	2/0				
<i>Troilus</i>	1/0	<i>Troilus luridus</i>	0	1/0	0	1/0				
Pyrrhocoridae	45/12	<i>Pyrrhocoris</i>	45/12	<i>Pyrrhocoris apterus</i> *	?	?	0	21/6	H10 až H12; H16; H18; H21	2, 21
				<i>Pyrrhocoris marginatus</i>	11/3	13/3	0	24/6	P59 až P64	1, 21
Reduviidae	18/1	<i>Rhynocoris</i>	18/1	<i>Rhynocoris iracundus</i>	10/1	8/0	0	18/1	P23	16, 25
Rhopalidae	39/1	<i>Brachycarenum</i>	1/0	<i>Brachycarenum tigrinus</i> *	0	1/0	0	1/0		
		<i>Corizus</i>	7/1	<i>Corizus hyoscyami</i> *	6/0	1/1	0	7/1	P37	?
		<i>Rhopalus</i>	12/0	<i>Rhopalus maculatus</i>	0	1/0	0	1/0		
				<i>Rhopalus parumpunctatus</i> *	7/0	1/0	0	8/0		
				<i>Rhopalus subrufus</i> *	3/0	0	0	3/0		
		<i>Stictopleurus</i>	19/0	<i>Stictopleurus abutilon</i> *	0	1/0	0	1/0		
<i>S. crassicornis</i> *	1/0			1/0	0	2/0				
				<i>S. punctatonervosus</i> *	7/0	9/0	0	16/0		
Rhyparochromidae	34/2	<i>Drymus</i>	1/0	<i>Drymus sylvaticus</i> *	1/0	0	0	1/0		
		<i>Gastrodes</i>	1/0	<i>Gastrodes grossipes</i>	0	1/0	0	1/0		
		<i>Megalonotus</i>	1/0	<i>Megalonotus sabulicola</i> *	0	1/0	0	1/0		
		<i>Peritrechus</i>	1/0	<i>Peritrechus geniculatus</i>	0	1/0	0	1/0		
		<i>Rhyparochromus</i>	21/0	<i>Rhyparochromus pini</i> *	1/0	0	0	1/0		
				<i>Rhyparochromus vulgaris</i> *	4/0	10/0	6/0	20/0		
		<i>Scolopostethus</i>	9/2	<i>Scolopostethus affinis</i> *	0	2/0	0	2/0		
<i>Scolopostethus thomsoni</i> *	2/0			5/2	0	7/2	P33; P34	3		
Scutelleridae	36/2	<i>Eurygaster</i>	36/2	<i>Eurygaster maura</i>	4/0	1/0	0	5/0		
				<i>Eurygaster testudinaria</i> *	18/1	13/1	0	31/2	P41; P70	1
Thyreocoridae	1/0	<i>Thyreocoris</i>	1/0	<i>Thyreocoris scarabaeoides</i>	0	1/0	0	1/0		
Tingidae	1/0	<i>Tingis</i>	1/0	<i>Tingis ampliata</i>	1/0	0	0	1/0		
Veliidae	13/0	<i>Velia</i>	13/0	<i>Velia caprai</i> *	3/0	10/0	0	13/0		
<b>celkem:</b>										
<b>27 čeledí</b>		<b>78 rodů</b>		<b>110 druhů</b>				<b>1210/77</b>		

<sup>1</sup> Ve sloupcích „Celkem“ jsou celkové počty vypitvaných ploštic, číslo za lomítkem udává počet infikovaných ploštic.

<sup>2</sup> M – samci, F – samice, N – nymfy

<sup>3</sup> Typová jednotka (TJ) stanovená na základě sekvencí pro SL (případně SSU).

<sup>4</sup> Hvězdička (\*) značí druhy, které byly odchyceny na lokalitě Předboř.



Obr 4.1 Závislost infikovanosti čeledi na počtu vyzkoušených kusů

Legenda: infikované ■, neinfikované ■

Pohlaví bylo určeno u 1088 ploštic. U 61 nymf to nebylo možné, vzhledem k nedovyvinutým pohlavním znakům. Celkem tedy u 1149 ploštic bylo zaznamenáno, zda se jedná o dospělce (samečka nebo samičku) či nymfu. Ve vyšetřovaném souboru bylo 592 samic, z nichž 40 (6,7 %) bylo nakažených trypanosomatidy. Nakažených samců bylo 29 (5,8 %) z 496 vyzkoušených. Prevalence nálezů se tedy mezi samci a samicemi statisticky významně neliší ( $\chi^2$ ,  $p=0,56$ ). Nymf bylo vyzkoušeno celkem 61, z toho nakažené byly dvě (3 %).

#### 4.1.2 Izolace trypanosomatid a jejich kultivace

Při pitvách ploštic bylo zjištěno, že v 77 jedincích se nachází trypanosomatida. Ve všech případech byl materiál infikovaného střeva použit k založení kultur. Kultivace se však zdařila pouze ve 37 % případů (29 izolátů) (viz tabulka 4.2). Tato malá záchytnost byla zčásti způsobena nekultivovatelností některých izolátů, malým množstvím buněk v hostiteli, ale také případnou kontaminací kvasinkami, bakteriemi nebo vláknými hub. V některých případech byla kontaminace tak velká, že se nepodařilo ani přečištění kultury přes U-trubici. Tato metoda také selhala v případě, kdy se buňky trypanosomatida množily malou rychlostí. Vykultivované izoláty byly dále analyzovány pomocí molekulárně-biologických metod. Morfologické analýzy nebyly dosud provedeny (s výjimkou izolátů H10 a P59).

Vzhledem ke skutečnosti, že se část buněk parazita ze střeva hostitele uchovávala zamražená v pufru, mohly být všechny vzorky analyzovány molekulárně-biologickými metodami. Získaná DNA z materiálu pocházejícího z pitvy plošnice se označovala jako environmentální (zkratka „envi“). Pokud bylo získáno více izolátů<sup>3</sup> z jednoho druhu plošnice a molekulárními analýzami se zjistilo, že jsou shodné, do dalších analýz byl zahrnut jen jeden z nich. V případě kultur se shodnost odhalila pomocí metody RAPD a u „envi“ vzorků pomocí amplifikace genu pro SL.

#### 4.1.3 Charakter infekce u ploštic

Přítomnost trypanosomatid byla zjišťována pitvou střeva a případná infekce v jiných orgánech (např. ve slinných žlázách nebo hemolymfě) nebyla zjišťována. Trypanosomatida byla lokalizována ve střední i zadní části střeva plošnice, a to buď pouze v jedné oblasti nebo v obou současně. Pouze ve střední části střeva (mesenteronu) byli paraziti objeveni v 17 % případů, v zadní části (proctodeu) ve 23 % případů. V 19 % infekcí byla trypanosomatida nalezena ve střední i zadní části střeva. V jednom případě byla infekce zjištěna v Malphigických trubicích. Některé infekce byly velmi slabé a paraziti byli odhaleni až po roztlaku střeva, v těchto případech nebylo možné určit přesnou lokalizaci infekce (36 % infekcí). Ve střevě byly pozorovány jak volné formy, tak i formy přisedlé na střevní stěně. Přehled o lokalizaci trypanosomatid ve střevě je uveden v tabulce 4.2.

Ve střevě ploštic byly přítomny různé počty buněk trypanosomatid (viz tab. 4.2). Míra infekce se pohybovala od několika buněk (+), přes několik stovek (++) až po velmi silné infekce, při kterých bylo ve střevě pozorováno řádově tisíce buněk (+++).

#### 4.1.4 Molekulární analýzy jednotlivých izolátů

V případě vykultivovaných izolátů byl přímo z PCR produktu osekvenován gen pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) a gen pro glykosomální glyceraldehyd-3-fostátdehydrogenázu (gGAPDH). Pomocí klonování byla získána sekvence pro gen „splice-leader“ (SL RNA). Pokud izoláty vykazovaly shodu již podle sekvence SSU, další geny byly sekvenovány pro jednoho vybraného zástupce. Celkem bylo získáno 21 sekvencí SSU, 15 sekvencí pro gGAPDH a 11 sekvencí pro SL RNA. V některých případech se dosud nezdařilo zaklonování příslušného úseku SL RNA.

U izolátů z plošnice *Pyrrhocoris marginatus* bylo dle sekvence SL RNA prokázáno, že je shodná s izolátem H10 získaným z plošnice *Pyrrhocoris apterus*, a proto další geny sekvenovány nebyly. Navíc z tohoto druhu bylo získáno více izolátů, jejichž identita byla potvrzena metodou RAPD (data nejsou zobrazena).

---

<sup>3</sup> Jako izolát označuji i „envi“ vzorky, tj. i případy, kdy se nepodařilo získat kulturu, ale pouze DNA parazitů.

Tab. 4.2 Přehled parazitovaných druhů ploštic, místu odchytu, pohlaví, místě a intenzitě infekce, získaných kultur a výsledků PCR SL z environmentálních vzorků.

Hostitel	Vzorek	Lokalita	Pohlaví	Síla infekce	Lokalizace <sup>1</sup>	Kultura	PCR SL ENVI	Počet <sup>2</sup> druhů	Sekv. <sup>3</sup>
<i>Adelphocoris quadripunctatus</i>	P39	Předboř	F	+++	MG + HG		+	1	1
<i>Apolygus lucorum</i>	P11	Předboř	M	+	HG		+	1	
<i>Arma custos</i>	P71	Předboř	F	+++	MG + HG		+	2	1
<i>Calocoris affinis</i>	P24	Předboř	M	++	MG		-		
	P30	Předboř	F	+++	MG		+	1	1
<i>Capsus ater</i>	P26	Předboř	M	++	HG		+	2	1
<i>Closterotomus norwegicus</i>	P07	Ruda	F	++	MG		+	1	1
	P10	Předboř	F	+++	MG	+	+	2	
<i>Coreus marginatus</i>	P09	Ruda	nymfa	+	MG		+	1	
	P36	Předboř	M	+++	MG		+	1	1
<i>Corizus hyoscyami</i>	P37	Předboř	F	+	po roztlaku		-		
<i>Dolycoris baccarum</i>	P02	Předboř	F	+++	?		+	1	1
	P04	Předboř	F	+++	MG		+	1	
	P48	Turnov	F	+++	MG + HG		+	1	1
<i>Dolycoris baccarum</i>	P49	Turnov	F	+++	MG + HG		+	1	
<i>Eurydema dominulus</i>	P58	Turnov	M	++	HG		+	1	1
<i>Eurygaster testudinaria</i>	P41	Turnov	F	+	po roztlaku		+	1	1
	P70	Turnov	M	+	po roztlaku		+	1	1
<i>Eysarcoris aeneus</i>	P57	Turnov	M	+++	HG	+	+	1	1
<i>Gerris gibbifer</i>	P01	Předboř	F	++	HG	+	+	1	
<i>Gerris odontogaster</i>	P31	Ruda	F	+++	MT	+	+	1	1
	P32	Ruda	M	+	po roztlaku		+	1	1
<i>Kleidocerys resedae</i>	P50	Turnov	M	+	MG		+	1	
	P51	Turnov	M	+	MG		+	1	
	P52	Turnov	M	+	po roztlaku		+	3	1
	P53	Turnov	F	+	po roztlaku		+	1	1
	P54	Turnov	M	+	po roztlaku		+	1	
<i>Leptopterna dolabrata</i>	P25	Předboř	F	+	po roztlaku		-		
<i>Liocoris tripustulatus</i>	P27	Předboř	F	+++	MG		+	1	1
<i>Lygus rugulipennis</i>	P06	Předboř	F	+	HG		+	1	
	P20	Předboř	M	++	MG + HG		+	1	1
<i>Megaloceroea relicticornis</i>	P28	Předboř	F	+	po roztlaku		+	1	1
<i>Nabis brevis</i>	P05	Předboř	F	++	MG	+	-		
	P16	Předboř	F	+++	MG + HG	+	+	1	
	P17	Předboř	F	+++	MG + HG	+	+	1	
	P18	Předboř	M	+	HG	+	-		
	P19	Předboř	F	++	MG + HG	+	-		
	P22	Předboř	F	+	HG	+	-		
<i>Nabis limbatus</i>	P38	Předboř	F	+	po roztlaku		+	1	1
	P12	Předboř	F	+++	HG	+	-		
<i>Nabis pseudoferus</i>	P08	Ruda	M	++	MG + HG	+	+	1	
	P13	Předboř	F	+++	HG	+	+	1	
	P21	Předboř	M	++	MG + HG	+	+	1	1
<i>Nabis rugosus</i>	P14	Předboř	F	+	HG	+	+	2	
	P15	Předboř	F	++	HG	+	-		
	P55	Turnov	M	++	HG	+	+	1	1

Hostitel	Vzorek	Lokalita	Pohlaví	Síla infekce	Lokalizace <sup>1</sup>	Kultura	PCR SL ENVI	Počet druhů <sup>2</sup>	Sekv. <sup>3</sup>
<i>Nabis</i> sp.	P35	Předboř	nymfa	+	po roztlaku		-		
<i>Nepa cinerea</i>	P42	Turnov	M	++	MG + HG		+	3 a více	1
	P43	Turnov	M	+	po roztlaku		+	3 a více	-
	P44	Turnov	M	+	po roztlaku		+	3 a více	-
	P45	Turnov	M	++	MG + HG		+	3 a více	-
	P46	Turnov	M	+	po roztlaku		+	3 a více	-
<i>Oxycarenus lavaterae</i>	P65	Skalky	F	+	po roztlaku		-		
	P66	Skalky	F	+	po roztlaku		-		
	P67	Skalky	F	+	po roztlaku		+	1	
	P68	Skalky	F	+	po roztlaku		+	1	
	P69	Skalky	M	+	po roztlaku		+	2	2
<i>Palomena prasina</i>	P40	Turnov	F	+	po roztlaku		+	1	1
<i>Pentatoma rufipes</i>	P56	Turnov	M	+	po roztlaku		+	2	1
<i>Picromerus bidens</i>	P47	Turnov	F	+	po roztlaku	+	+	1	1
<i>Pyrrhocoris apterus</i>	H10	Praha	nedeterm.	+++	MG + HG	+	+	1	
	H11	Praha	nedeterm.	++	MG	+	+	2	
	H12	Praha	nedeterm.	++	MG		-		
	H16	Předboř	nedeterm.	+	MG		-		
	H18	Předboř	nedeterm.	++	MG	+	+	1	
	H21	Předboř	nedeterm.	++	MG	+	+	1	1
<i>Pyrrhocoris marginatus</i>	P59	Skalky	F	+	po roztlaku	+	-		
	P60	Skalky	M	++	MG		-		
	P61	Skalky	M	+	po roztlaku	+	-		
	P62	Skalky	F	++	MG	+	+	1	
	P63	Skalky	M	+	po roztlaku	+	+	1	1
	P64	Skalky	F	+	po roztlaku	+	+	1	
<i>Rhynocoris iracundus</i>	P23	Praha	M	+++	MG + HG	+	+	1	1
<i>Scolopostethus thomsoni</i>	P33	Předboř	F	+++	?		+	1	1
	P34	Předboř	F	+	po roztlaku		+	1	1
<i>Stenotus binotatus</i>	P03	Předboř	M	++	MG + HG		-		
	P29	Předboř	F	+	?	+	+	2	3

<sup>1</sup> Místo lokalizace ve střevě je označeno HG – zadní střevo, MG – střední střevo a MT – Malphigické trubice, „po roztlaku“ – při pitvě byla trypanosomatida detekována až po roztlaku střeva, z tohoto důvodu nebylo možné určit přesnou lokalizaci infekce.

<sup>2</sup> Počet druhů udává počet pruhů na elektroforetogramu. Velikost produktu amplifikace SL RNA je značně variabilní a do jisté míry druhově specifická.

<sup>3</sup> Ve sloupci „Sekv.“ jsou uvedeny počty získaných rozdílných sekvencí genu SL RNA.

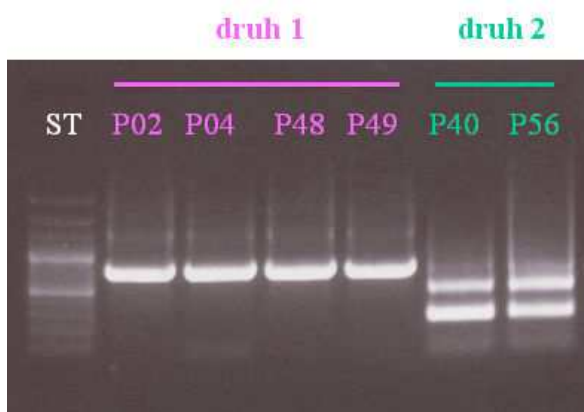
Pozitivní výsledek kultivace, PCR SL ENVI a sekvenace je označen znaménkem „+“.

U izolátů, z nichž nebyla získána kultura z důvodu jejich nekultivovatelnosti nebo kvůli kontaminaci, posloužila k odhalení jejich diverzity amplifikace genu pro SL RNA. Výhodou této metody je, že již podle velikosti produktu PCR na elektroforetogramu se mohly odlišit jednotlivé druhy a také bylo možné odhalit směsné infekce. Bohužel v 18ti případech byl i po zopakování výsledek PCR negativní. Pokud na elektroforetogramu vykazoval produkt PCR stejnou velikost a jednalo se o izoláty ze stejné lokality a stejného druhu plošnice nebo



z velice si blízkých druhů, k zaklonování genu pro SL RNA jsme přistoupili pouze u jednoho vybraného zástupce, což je zdokumentováno na příkladu nekultivovatelných izolátů (obr. 4.2).

Metodou amplifikace SL RNA bylo odhaleno 13 směsných infekcí (H11, P10, P14, P26, P29, P42 až P46, P52, P59, P69, P71). Z důvodu ne vždy úspěšného klonování však dosud nejsou k dispozici sekvence všech zjištěných druhů trypanosomatid. V některých případech jsme získali různé výsledky na základě sekvence získané z environmentálních vzorků a z kultury. Jedná se např. o izolát P29 z plošnice *Stenotus binotatus*, kdy na elektroforetogramu PCR SL RNA z „envi“ vzorku byly přítomny dva bandy. Po zaklonování a sekvenaci jsme získali dokonce tři různé sekvence, protože dva organismy měly zřejmě stejnou velikost PCR produktu, a proto od sebe nebyly odlišitelné na elektroforetogramu. Tyto tři druhy jsou evidentně nekultivovatelné, jelikož výsledek sekvenace SL RNA z vykultivovaného organismu byl naprosto odlišný. Tyto čtyři sekvence mají i různé umístění v rámci fylogenetického stromu dle SL RNA.



Obr. 4.2 Ukázka rozlišení stejného druhu trypanosomatida dle velikosti PCR produktu genu SL RNA. Standard: 3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100 bp

Nejinak je tomu u izolátu P47 z plošnice *Picromerus bidens*, kdy se sekvence SSU z kultury a environmentálního vzorku od sebe naprosto liší. Výsledek klonování genu pro SL z kultury (na rozdíl od „envi“ vzorku) dosud nebyl pozitivní a sekvence tak není dostupná pro fylogenetické analýzy. Topologie „envi“ sekvencí v rámci obou stromů (SSU i SL) si vzájemně odpovídají.

Výsledky PCR genu SL z environmentálních vzorků jsou uvedeny v tabulce 4.2 společně s údaji, kolik pruhů resp. jednotlivých druhů trypanosomatid bylo vidět na elektroforetogramu a kolik rozdílných sekvencí SL RNA se podařilo získat.

#### 4.1.5 Rozdělení českých izolátů do skupin

Podle výsledků získaných z fylogenetických analýz (strom SL počítaný metodou NJ, strom SSU počítaný metodou MrB a ML) se české izoláty rozdělily do několika typových skupin. Pro určení shodnosti/rozdílnosti byla stanovena hranice 10% podobnosti sekvencí SL RNA (dle Westenberger a kol., 2004). Na SL stromě se vytvořilo 21 typových skupin, z toho 12 bylo zcela nových. U ostatních se prokázala shodnost s již dříve publikovanými typovými jednotkami např. TJ01/Ch1/TU44 nebo s již popsány druhy (TJ16 – *Crithidia fasciculata*, TJ21 – *Leptomonas pyrrhocoris*). Po kontrole s SSU stromem bylo potvrzeno 10 typových jednotek, u ostatních jsme dosud nezískali sekvence pro SSU. Navíc se však vytvořilo šest nových jednotek dle sekvencí SSU (sekvence SL nejsou pro tyto jednotky zatím k dispozici). Celkem tedy vzniklo pro trypanosomatida českých ploštic 27 typových jednotek, z čehož některé mohou být brány jako potenciálně nové druhy. Přehled typových jednotek je uveden v tabulce 4.3.

Tab. 4.3 Přehled typových jednotek izolátů z českých ploštic

Typová jednotka	Gen <sup>1</sup>	Shodnost	Izoláty <sup>2</sup>	Hostitelé
TJ01	SL, SSU	Ch1, TU44	P02 ENVI, P04 ENVI, P48 ENVI, P49 ENVI	<i>Dolycoris baccarum</i> (Pentatomidae)
			P41 ENVI, P70 ENVI	<i>Eurygaster testudinaria</i> (Scutelleridae)
			P57, P57 ENVI	<i>Eysarcoris aeneus</i> (Pentatomidae)
			P58 ENVI	<i>Eurydema dominulus</i> (Pentatomidae)
			P63 ENVI	<i>Pyrrhocoris marginatus</i> (Pyrrhocoridae)
			P69 ENVI	<i>Oxycarenus lavaterae</i> (Oxycarenidae)
TJ02	SL, SSU		H21 ENVI	<i>Pyrrhocoris apterus</i> (Pyrrhocoridae)
TJ03	SL, SSU		P33 ENVI, P34 ENVI	<i>Scolopostethus thomsoni</i> (Rhyparochromidae)
TJ04	SL	TU17	P07 ENVI	<i>Closterotomus norwegicus</i> (Miridae)
			P11 ENVI	<i>Apolygus lucorum</i> (Miridae)
			P20 ENVI, P06 ENVI	<i>Lygus rugulipennis</i> (Miridae)
			P27 ENVI	<i>Liocoris tripustulatus</i> (Miridae)
			P29 ENVI 1	<i>Stenotus binotatus</i> (Miridae)
			P30 ENVI	<i>Calocoris affinis</i> (Miridae)
			P39 ENVI	<i>Adelphocoris quadripunctatus</i> (Miridae)
TJ05	SL		P69 ENVI 2	<i>Oxycarenus lavaterae</i> (Oxycarenidae)
TJ06	SL, SSU		P40 ENVI	<i>Palomena prasina</i> (Pentatomidae)
			P56 ENVI	<i>Pentatoma rufipes</i> (Pentatomidae)
TJ07	SL		P53 ENVI	<i>Kleidocerys resedae</i> (Lygaeidae)
TJ08	SL, SSU		P52 ENVI	<i>Kleidocerys resedae</i> (Lygaeidae)
TJ09	SL, SSU		P31 ENVI, P32 ENVI	<i>Gerris odontogaster</i> (Gerridae)
TJ10	SL	Ch14, TU6/7	P29 ENVI 2	<i>Stenotus binotatus</i> (Miridae)
TJ11	SL, SSU		P36 ENVI	<i>Coreus marginatus</i> (Coreidae)
			P30 ENVI - SSU	<i>Calocoris affinis</i> (Miridae)
TJ12	SL		P71 ENVI	<i>Arma custos</i> (Pentatomidae)
TJ13	SL		P29 ENVI 3	<i>Stenotus binotatus</i> (Miridae)

Typová jednotka	Gen <sup>1</sup>	Shodnost	Izoláty <sup>2</sup>	Hostitelé
TJ14	SL		P18	<i>Nabis brevis</i> (Nabidae)
TJ15	SL, SSU		P10	<i>Closterotomus norwegicus</i> (Miridae)
			P14, P19 (SL), P38 ENVI	<i>Nabis brevis</i> (Nabidae)
			P28 ENVI	<i>Megaloceroea relicticornis</i> (Miridae)
			P29	<i>Stenotus binotatus</i> (Miridae)
			P55 ENVI	<i>Nabis rugosus</i> (Nabidae)
TJ16	SL, SSU	<i>C. fasciculata</i>	P17 (SL)	<i>Nabis brevis</i> (Nabidae)
			P21 (SL)	<i>Nabis pseudoferus</i> (Nabidae)
			P23 ENVI	<i>Rhynocoris iracundus</i> (Reduviidae)
			P26 ENVI	<i>Capsus ater</i> (Miridae)
TJ17	SL		P47 ENVI	<i>Picromerus bidens</i> (Pentatomidae)
TJ18	SSU		P01	<i>Gerris gibbifer</i> (Gerridae)
			P05	<i>Nabis brevis</i> (Nabidae)
			P08	<i>Nabis pseudoferus</i> (Nabidae)
TJ19	SL, SSU		P12	<i>Nabis limbatus</i> (Nabidae)
			P15	<i>Nabis rugosus</i> (Nabidae)
TJ20	SL		P42 ENVI	<i>Nepa cinerea</i> (Nepidae)
TJ21	SL, SSU	<i>L. pyrrhocoris</i>	H10, H11, H18, H21	<i>Pyrrhocoris apterus</i> (Pyrrhocoridae)
			P59 - P64	<i>Pyrrhocoris marginatus</i> (Pyrrhocoridae)
TJ22	SSU		P13	<i>Nabis pseudoferus</i> (Nabidae)
			P16, P19	<i>Nabis brevis</i> (Nabidae)
TJ23	SSU		P22	<i>Nabis brevis</i> (Nabidae)
TJ24	SSU		P47	<i>Picromerus bidens</i> (Pentatomidae)
TJ25	SSU		P23	<i>Rhynocoris iracundus</i> (Reduviidae)
TJ47	SL		P08	<i>Nabis pseudoferus</i> (Nabidae)
TJ60	SSU		P17 (SSU)	<i>Nabis brevis</i> (Nabidae)
			P21 (SSU)	<i>Nabis pseudoferus</i> (Nabidae)

<sup>1</sup> „Gen“ udává sekvenci, na základě které byla vytvořena daná typová jednotka.

<sup>2</sup> Označení „ENVI“ odpovídá sekvencím získaným z environmentálních vzorků, zatímco sekvence bez tohoto označení jsou získány z kultury parazitů. „Gen“ udává sekvenci, na základě které byla vytvořena daná typová jednotka.

## 4.2 Vzorky z Francie, Sicílie a Ghany<sup>4</sup>

V roce 2007 bylo v jižní Francii (v okolí města Montpellier) vypitváno 277 ploštic patřících do 48 druhů. Pitvou u nich byla zjišťována přítomnost trypanosomatid (tabulka 4.5) (Votýpka, nepublikovaná data). Celkem bylo získáno 14 izolátů jednohostitelských trypanosomatid z šesti druhů ploštic. Kultura je dostupná pro čtyři z nich (F19, F165, F221, F222). Přehled infikovaných ploštic je uveden v tabulce 4.4.

<sup>4</sup> V následujících tabulkách a na fylogenetických stromech se vyskytují i další izoláty z ploštic a případně i dalšího hmyzu, které byly získány méně systematickým sběrem v rámci různých výzkumů a jsou zařazeny zejména pro demonstraci geografického rozšíření izolátů a pro analýzu hostitelské specifičnosti.

Tab. 4.4 Přehled infikovaných ploštic z Francie

Čeď	Druh	Izolát	Lokalita	Intenzita infekce <sup>1</sup>	Lokalizace	PCR SL ENVI	Počet druhů	Sekv.
Pyrrhocoridae	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	F19	Babusérie	+++	MG	+	1	1
	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	F20	Babusérie	++++	MG	?		
	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	F115	Montferrier	+++	MG	+	2	1
	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	F165	Montferrier	+++	MG	+	1	1
	<i>Scantius aegyptius rossii</i>	F220	Montpellier	+	MG	+	1	1
	<i>Scantius aegyptius rossii</i>	F221	Montpellier	++	MG	+	1	1
	<i>Scantius aegyptius rossii</i>	F222	Montpellier	+	MG	?		
Rhopalidae	<i>Corizus hyoscyami</i>	F17	Babusérie	++++	MG + HG	+	1	1
	<i>Stictopleurus punctatonervosus</i>	F46	Montferrier	+++	MG + HG	+	1	1
	<i>Stictopleurus parumpunctatus</i>	F96	Montferrier	+	HG	+	1	1
	<i>Stictopleurus parumpunctatus</i>	F98	Montferrier	++++	MG + HG + MT	+	1	1
	<i>Stictopleurus punctatonervosus</i>	F167	Montferrier	+++	HG	+	1	1
	<i>Maccevetus sp.</i>	F241	Lunel a okolí	++++	MG + HG	+	1	1
	<i>Stictopleurus punctatonervosus</i>	F248	Lunel a okolí	++++	HG	+	1	1

<sup>1</sup> Míra infekce se pohybovala od velmi slabých (+), středních (++) , silných (+++) až po velmi silné (++++) infekce

Tab. 4.5 Přehled vylíčených ploštic z Francie

Čeď	Celkem	Rod	Celkem	Druh	Celkem	Izolát
Coreidae	8/0	<i>Centrocoris</i>	2/0	<i>Centrocoris spiniger</i>	2/0	
		<i>Coreus</i>	1/0	<i>Coreus marginatus</i>	1/0	
		<i>Enoplops</i>	2/0	<i>Enoplops scapha</i>	2/0	
		<i>Leptoglossus</i>	3/0	<i>Leptoglossus occidentalis</i>	3/0	
Geocoridae	2/0	<i>Henestaris</i>	2/0	<i>Henestaris laticeps</i>	2/0	
Gerridae	4/0	<i>Aquarius</i>	4/0	<i>Aquarius najas</i>	2/0	
				<i>Aquarius paludum paludum</i>	1/0	
				<i>Aquarius sp.</i>	1/0	
Lygaeidae	18/0	<i>Lygaeus</i>	6/0	<i>Lygaeus equestris</i>	6/0	
		<i>Nysius</i>	11/0	<i>Nysius graminicola</i>	11/0	
		<i>Spilostethus</i>	1/0	<i>Spilostethus pandurus</i>	1/0	
Miridae	39/0	<i>Adelphocoris</i>	2/0	<i>Adelphocoris lineolatus</i>	2/0	
		<i>Dicyphus</i>	1/0	<i>Dicyphus errans</i>	1/0	
		<i>Lygus</i>	25/0	<i>Lygus gemellatus</i>	16/0	
				<i>Lygus pratensis</i>	4/0	
				<i>Lygus sp.</i>	5/0	
		<i>Neolygus</i>	9/0	<i>Neolygus sp.</i>	9/0	
<i>Stenodema</i>	2/0	<i>Stenodema calcarata</i>	2/0			
Nabidae	2/0	<i>Nabis</i>	2/0	<i>Nabis sp.</i>	2/0	
Pentatomidae	86/0	<i>Aelia</i>	4/0	<i>Aelia acuminata</i>	3/0	
				<i>Aelia rostrata</i>	1/0	
		<i>Ancyrosoma</i>	5/0	<i>Ancyrosoma leucogrammes</i>	5/0	
		<i>Carpocoris</i>	6/0	<i>Carpocoris fuscispinus</i>	5/0	
				<i>Carpocoris sp.</i>	1/0	
		<i>Anthemina</i>	2/0	<i>cf. Anthemina varicornis</i>	2/0	
		<i>Dolycoris</i>	2/0	<i>Dolycoris baccarum</i>	2/0	
		<i>Eurydema</i>	6/0	<i>Eurydema ornata</i>	3/0	
				<i>Eurydema ventralis</i>	3/0	
		<i>Graphosoma</i>	11/0	<i>Graphosoma lineatum</i>	11/0	
		<i>Nezara</i>	2/0	<i>Nezara viridula</i>	2/0	
<i>Sciocoris</i>	2/0	<i>Sciocoris sp.</i>	2/0			
<i>Staria</i>	10/0	<i>Staria lunata</i>	10/0			

Čeleď	Celkem	Rod	Celkem	Druh	Celkem	Izolát
Pyrrhocoridae	27/7	<i>Pyrrhocoris</i>	14/4	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	14/4	F19;F20; F115; F165
		<i>Scantius</i>	13/3	<i>Scantius aegyptius rossii</i>	13/3	F220; F221; F222
Rhopalidae	88/7	<i>Corizus</i>	3/1	<i>Corizus hyoscyami</i>	3/1	F17
		<i>Chorosoma</i>	4/0	<i>Chorosoma schillingii</i>	4/0	
		<i>Liorhyssus</i>	2/0	<i>Liorhyssus hyalinus</i>	2/0	
		<i>Maccevethus</i>	8/1	<i>Maccevethus corsicus corsicus</i>	4/0	
				<i>Maccevethus sp.</i>	4/1	F241
		<i>Myrmus</i>	1/0	<i>Myrmus miriformis</i>	1/0	
		<i>Rhopalus</i>	6/0	<i>Rhopalus subrufus</i>	5/0	
				<i>Rhopalus parumpunctatus</i>	1/0	
		<i>Stictopleurus</i>	65/5	<i>Stictopleurus abutilon</i>	8/0	
				<i>Stictopleurus parumpunctatus</i>	7/2	F96; F98
<i>Stictopleurus punctatonervosus</i>	44/3			F46;F167; F248		
<i>Stictopleurus sp.</i>	6/0					
Rhyparochromidae	1/0	<i>Ischnopeza</i>	1/0	<i>Ischnopeza hirticornis</i>	1/0	
Scutelleridae	1/0	<i>Odontotarsus</i>	1/0	<i>Odontotarsus sp.</i>	1/0	
<b>celkem:</b>						
11 čeledí		36 rodů		48 druhů		277/14

Obdobná data (zejména určení hostitelů) však zatím nejsou dostupná k izolátům pocházejících z Ghany. Na tomto území proběhla studie jednohostitelských trypanosomatid u ploštic v roce 2009 (Votýpka, nepublikovaná data). Celkem bylo získáno 68 izolátů, z nichž šest je dostupných v kultuře. Hostitelské ploštice dosud nejsou determinovány, avšak byly předběžně rozřazeny do skupin podle vnější podobnosti. Dále jsme získali od Milana Jirků k analýzám izoláty ze Sicílie<sup>5</sup> (tabulka 4.6), ze kterých jsou pouze dvě dostupné v kultuře. Ostatní jsou ve stavu environmentálních vzorků.

Tab. 4.6 Přehled izolátů ze Sicílie

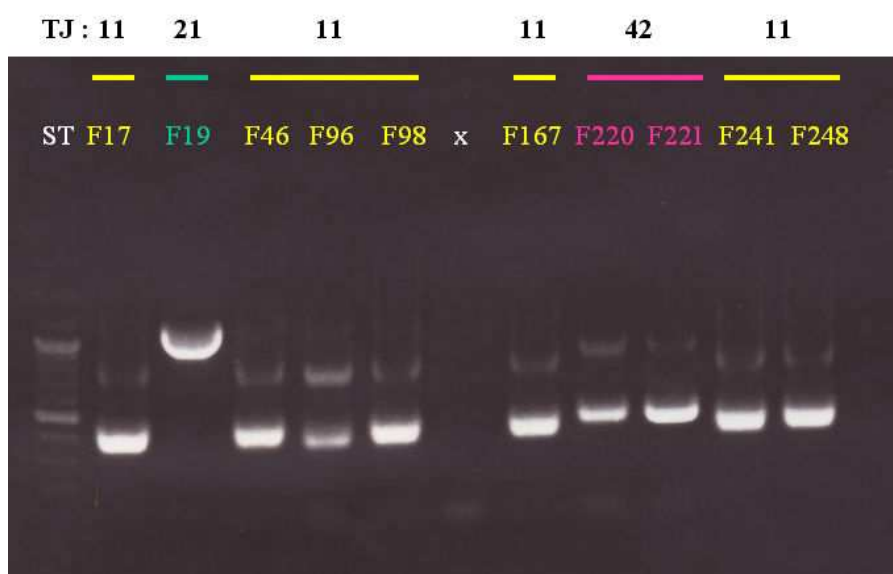
Izolát	Hostitel	Čeleď
Si01	<i>Eurydema oleracea</i>	Pentatomidae
Si02	<i>Lygaeus creticus</i>	Lygaeidae
Si03	<i>Lygaeus creticus</i>	Lygaeidae
Si04	<i>Aquarius cinereus</i>	Gerridae
Si05	<i>Aquarius cinereus</i>	Gerridae
Si06	<i>Notonecta sp. (nymfa)</i>	Notonectidae
Si07	<i>Aquarius cinereus</i>	Gerridae
Si08	<i>Aquarius cinereus</i>	Gerridae
Si09	<i>Aquarius cinereus</i>	Gerridae
Si10	<i>Horvathiolus gibbicollis</i>	Lygaeidae
Si11	nedeterminováno	
Si12	<i>Lygaeus creticus (nymfa)</i>	Lygaeidae
Si13	<i>Closterotomus trivialis</i>	Miridae
Si14	<i>Melanocoryphus albomaculatus</i>	Lygaeidae
Si15	<i>Rhynocoris sp. (nymfa)</i>	Reduviidae
Si16	<i>Apterola kuenckel</i>	Lygaeidae
Si17	<i>Apterola kuenckel</i>	Lygaeidae
Si18	<i>Dicranocephalus albipes</i>	Stenocephalidae

<sup>5</sup> Z Českých Budějovic jsme získali i řadu sekvencí pro SL RNA. Přehled viz tabulka 4.9.

#### 4.2.1 Analýza jednotlivých vzorků

Molekulární analýza vzorků probíhala v souladu s výše zmíněnými postupy. U DNA, která byla získána z buněk v kultuře, byl osekvenován gen pro SSU, gGAPDH a zaklonováním se získala sekvence pro SL. Morfologické analýzy nebyly dosud provedeny (vyjma izolátů G59, F19, F165).

Francouzské plošnice byly rozřazeny podle velikosti SL amplifikované z environmentálního vzorku do tří skupin (obr. 4.3). Izolát F19 byl přiřazen k druhu *Leptomonas pyrrocoris*. Vyhodnocení PCR SL RNA je uvedeno v tabulce 4.4 společně s přehledem získaných sekvencí.



Obr. 4.3 Francouzské izoláty rozřazené do 3 typů. Standard: 3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100 bp

Environmentální vzorky z Ghany a Sicílie byly vyhodnocovány ve spolupráci s Parazitologickým ústavem AVČR v Českých Budějovicích (konkrétně M. Jirků). Při molekulárních analýzách jsme postupovali jako u českých izolátů. U environmentálních vzorků se porovnávala velikost produktu PCR pro SL RNA. Pokud byla na elektroforetogramu zjištěna stejná velikost produktu u ploštic stejného druhu pocházející z jedné lokality, přistoupilo se k sekvenaci pouze jednoho vybraného vzorku. Bylo zaznamenáno, že v rámci stejného druhu/typu plošnice bylo přítomno více druhů parazitů (obr. 4.4) a také byly zjištěny směsné infekce (tabulka 4.7).

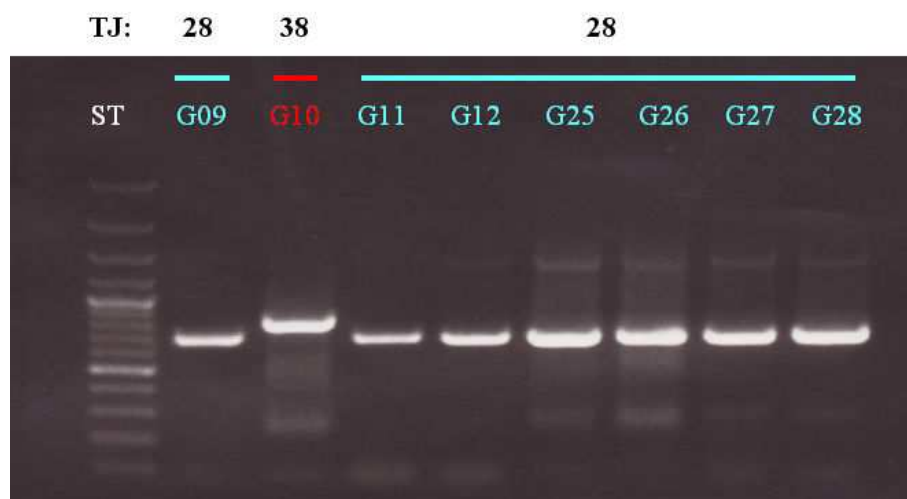
Tab. 4.7 Celkový přehled ghanských izolátů a výsledků jejich analýzy

Typ <sup>1</sup> plošnice	Izolát	Kultura	PCR SL ENVI	Počet druhů	Sekvence	Sekvence SL (kultura)	Sekvence SSU (kultura)	Sekvence gGAPDH (kultura)
1	G01		+	1	1			
1	G02		+	2				
2	G03		+	2				
2	G04		+	3				
2	G05		+	2				
2	G06		+	2				
2	G07	+	+	2	2	+	+	
2	G08		+	2				
3	G09		+	1	1			
3	G10		+	2	1			
3	G11		+	1				
3	G12		+	1				
4	G13		+	2	1			
5	G14		+	3	1			
6	G15	+	+	2	1		+	
7	G16		+	2	1			
7	G17		+	2				
8	G18		+	1				
8	G19		+	1	1			
9	G20		+	1	1			
10	G21		+	1	1			
10	G22		+	2	1			
11	G23		+	2	1			
12	G24		+	1	1			
3	G25		+	2	1			
3	G26		+	2				
3	G27		+	2				
3	G28		+	2				
13	G29		+	2	1			
14	G30	+	+	?	2		+	
13	G31		+	2	1			
15	G32		+	2	1			
16	G33		+	2	1			
17	G34		+	?	1			
18	G35		+	1	1			
19	G36		+	1	1			
20	G37	+	+	1	1		+	
21	G38		+	?	3			
22	G39		+	2				
23	G40		+	1	1			
24	G41		+	1				
25	G42		+	1				
10	G43		+	2				
26	G44		+	1	1			
3	G45		+	1	1			
27	G46		+	1				
28	G47		+	1	1			
29	G48		+	1	1			
28	G49		+	1				
30	G50		+	1	1			
30	G51		+	1				
31	G52		+	2	1			
32	G53		+	2	1			
33	G54		+	1	1			
34	G55		+	1	1			
32	G56		+	1				
35	G57		+	1	1			

Typ <sup>1</sup> plošnice	Izolát	Kultura	PCR SL ENVI	Počet druhů	Sekve- nce	Sekvence SL (kultura)	Sekvence SSU (kultura)	Sekvence gGAPDH (kultura)
2	G58	+	+	2		+	+	+
2	G59	+	+	2	2	+	+	
36	G60		+	?	1			
37	G61		+	?	2			
38	G62		+	?				
39	G63		+	?	2			
40	G64		+	?	2			
41	G65		+	?	2			
42	G66		+	?	3			
42	G67		+	?	2			
3	G68		+	1	1			

Pozitivní výsledek je značen znaménkem „+“

<sup>1</sup> Typ plošnice je předběžné přiřazení ploštic do druhu na základě vnější podobnosti.



Obr. 4.3 Ghanské izoláty z jednoho druhu (typ 3) plošnice. Standard: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

#### 4.2.2 Rozdělení izolátů do skupin

Podle principu dělení českých plošticích izolátů do typových jednotek, byla provedena obdobná analýza u všech získaných izolátů z ploštic. Vzniklo tak celkem 49 typových jednotek (tabulka 4.8). Z nich tři představují již popsané druhy (**TJ16/C. fasciculata**, **TJ40/C. luciliae thermophila** a **TJ21/L. pyrrhocoris**) a u šesti vytvořených skupin se zjistila shodnost s nedávno vytvořenými typovými jednotkami z Jižní Ameriky a Číny (Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010): **TJ01/Ch1/TU44**, **TJ04/TU17**, **TJ10/Ch14/TU6/7**, **TJ38/Ch8**, **TJ43/Ch2**, **TJ46/Ch15**. Do typových jednotek byly též zařazeny nově získané a dosud nepublikované izoláty z dvoukřídlých a blech, takže vzniklo dalších 11 jednotek, celkem tedy 60 typových jednotek (TJ).



Tab. 4.8 Souhrnný přehled typových jednotek ustanovených na základě sekvenční podobnosti pro SL RNA nebo SSU rRNA

Typová jednotka	Shodnost	Země původu izolátu	Izoláty <sup>1</sup>	Hostitel (řád) mimo Heteroptera
TJ01	Ch1 / TU44	ČR	P02 ENVI, P04 ENVI, P41 ENVI, P48 ENVI, P49 ENVI, P57, P57 ENVI, P58 ENVI, P63 ENVI, P69 ENVI, P70 ENVI	
		Ghana	G16, G52, G55	
TJ02		ČR	H21	
TJ03		ČR	P33 ENVI, P34 ENVI	
TJ04	TU17	ČR	P06 ENVI, P07 ENVI, P11 ENVI, P20 ENVI, P27 ENVI, P29 ENVI 1, P30 ENVI, P39 ENVI	
		ČR	PHA1 T, K97	Nematocera
		Ghana	G19	
TJ05		ČR	P69 ENVI 2	
TJ06		ČR	P40 ENVI, P56 ENVI	
TJ07		ČR	P53 ENVI	
TJ08		ČR	P52 ENVI	
TJ09		ČR	P31 ENVI, P32 ENVI	
TJ10	Ch14, TU6/7	ČR	P29 ENVI 2	
		Ghana	G01, G15, G20, G61 (ENVI 1)	
		Itálie	Si07 B	
TJ11		ČR	P30 ENVI (SSU), P36 ENVI	
		Ghana	G33	
		Francie	F17, F46, F98, F115, F167, F248	
TJ12		ČR	P71	
TJ13		ČR	P29 ENVI 3	
TJ14		ČR	P18	
TJ15		ČR	P14, P19, P28 ENVI, P29 (SL), P38 ENVI, P55 ENVI	
		ČR	Ps29, PHA1 L, CUL43	Nematocera
		Ghana	G22	
TJ16	<i>C. fasciculata</i>	ČR	P17 (SL), P21 (SL), P21 ENVI, P23 ENVI, P26 ENVI	
		ČR	CUL35, CUL44	Nematocera
TJ17		ČR	P47 ENVI (SL)	
TJ18		ČR	P01, P05, P08 (SSU)	
		ČR	B481 (SSU)	Siphonaptera
TJ19		ČR	P12, P15	
TJ20		ČR	P42 ENVI	
TJ21	<i>L. pyrrhocoris</i> , Ch11, TU1	ČR	H10, H11, H18, H21, P59 – P64	
		Slovensko	SK03	
		Ghana	G07, G58, G59	
		Francie	F19, F165	
		Kypr	KYPR10	
TJ22		ČR	P13, P16, P19 (SSU)	
		ČR	B873	Siphonaptera
TJ23		ČR	P22	
TJ24		ČR	P47 (SSU)	
TJ25		ČR	P23	
		Itálie	Si15	
TJ26		Ghana	G13	
TJ27		Ghana	G35	

Typová jednotka	Shodnost	Země původu izolátu	Izoláty <sup>1</sup>	Hostitel (řád) mimo Heteroptera
TJ28		Ghana	G09, G25, G45	
TJ29		Ghana	G21	
TJ30		Ghana	G24	
TJ31		Ghana	G38 (ENVI 3), G61 (ENVI 2), G66 (ENVI 3)	
TJ32		Ghana	G30 (ENVI 2), G38 (ENVI 1), G63 (ENVI 2), G64 (ENVI 1), G65 (ENVI 1), G68	
TJ33		Ghana	G29, G31, G44	
TJ34		Ghana	G67 (ENVI 1)	
TJ35		Ghana	G63 (ENVI 1), G66 (ENVI 1), G67 (ENVI 2)	
TJ36		Ghana	G40	
TJ37		Ghana	G07 (ENVI)	
TJ38	Ch8	Ghana	G10	
TJ39		Ghana	G14, G23, G30 (ENVI 1), G34, G38 (ENVI 2), G60, G64 (ENVI 2), G65 (ENVI 2), G66 (ENVI 3)	
		Itálie	Si05	
TJ40	<i>C. luciliae thermophila</i>	Ghana	G32, G37	
TJ41		Itálie	Si10, Si17	
TJ42		Francie	F221	
		Tunis	TU	
		Kypr	KYPR01	
TJ43	Ch2	Slovensko	SK02 ENVI	
TJ44	TU1? <sup>2</sup>	Ekvádor	124AL	
TJ45		Itálie	Si03, Si12	
TJ46	Ch15	Itálie	Si04, Si07 A	
TJ47		ČR	P08 (SL)	Siphonaptera
		ČR	B466	
TJ48		Ghana	G36, G47, G48, G50, G54, G57	
TJ49		Kostarika	Dipt07	Brachycera
TJ50		Kostarika	Dipt08	Brachycera
TJ51		ČR	K06 A	Nematocera
		ČR	B604 2, B1134	Siphonaptera
TJ52		ČR	J13, JEZ1	Siphonaptera
		ČR	Ps46	Nematocera
TJ53		ČR	Ps29 A	Nematocera
		ČR	B66	Siphonaptera
TJ54		Anglie	AgT6b	Nematocera
TJ55	<i>H. trimorpha</i> (CER9)	Anglie	AgT2	Nematocera
		ČR	K123 B, K124, TIP061	Nematocera
TJ56		ČR	K06 B	Nematocera
		Anglie	AgT6a, AgT4	Nematocera
TJ57	<i>W. brevicula</i>	ČR	CUL26, CUL34, CUL40, K36, K37, K42, K53	Nematocera
TJ58		ČR	CUL13, K73	Nematocera
		ČR	B481 (SL)	Siphonaptera
TJ59		Austrálie	AustT3	Nematocera
TJ60		ČR	P17 (SSU), P21 (SSU)	

<sup>1</sup> V závorkách je uvedeno, dle kterého genu byla typová jednotka vytvořena. U některých izolátů totiž došlo k nesrovnalostem v topologii mezi SL a SSU stromem.

<sup>2</sup> Izolát 124AL byl přiřazen na základě částečné sekvence SL k TU1, což se ukázalo být chybné.

### 4.3 Fylogenetické analýzy

U izolátů z kultury byl přímo z PCR produktu osekvenován gen pro SSU RNA. U vybraných zástupců se dále sekvenoval gen pro gGAPDH a SL RNA (minimálně dva klony pro každý izolát). U environmentálních vzorků byl sekvenován gen pro SL RNA a pokud to bylo možné i gen pro SSU rRNA. Přehled všech získaných sekvencí v průběhu této práce je uveden v tabulce 4.9. Výsledný alignment po všech úpravách měl délku pro SSU rRNA 1820 bp, pro gGAPDH 902 bp a pro konzervativní část SL RNA 242 bp. U izolátů ze skupiny druhu *Leptomonas pyrrocoris* byla provedena analýza celého genu SL RNA včetně hypervariabilní intergenové oblasti. Do fylogenetických analýz byly zařazeny dostupné sekvence SSU a gGAPDH kinetoplastid z databáze GenBank (viz tabulka 3.16) a také nepublikované sekvence trypanosomatid získané od členů našeho vědeckého týmu. Dataset potřebný pro fylogenetickou analýzu genu SL RNA byl poskytnut D. A. Maslovem. Některé sekvence ghanských izolátů byly získány ve spolupráci s Parazitologickým ústavem AVČR v Českých Budějovicích (tabulka 4.9).

Fylogenetický strom na obrázku 4.5 (a-j) je vytvořen na základě sekvencí pro gen SSU rRNA Bayesovskou metodou (MrB). Na obrázku 4.6 je zobrazen fylogenetický strom dle sekvencí pro gen gGAPDH, který byl rovněž vytvořen Bayesovskou metodou (MrB). Strom pro gen SL RNA byl vytvořen metodou „neighbor-joining“ (NJ) (obr. 4.7 a-g). V uzlech větví jsou uvedeny bootstrapové hodnoty získané metodami MrB (program MrBayes) nebo ML (program PhyML). Charakter dat daných sekvencemi genu SL RNA dovolil výpočet statistické podpory pouze použitím metody NJ.

Výsledky fylogenetických analýz potvrdily příslušnost všech sekvenovaných izolátů z ploštic k jednohostitelským trypanosomatidům. Výjimkou je typová jednotka TJ06 (P40 ENVI, P56 ENVI), která náleží do dvouhostitelského rodu *Phytomonas*. Jednotlivé izoláty jsou rozprostřeny v rámci celého fylogenetického stromu. U některých izolátů se potvrdila příslušnost k již dříve popsáným typovým jednotkám (**TJ1**/Ch1/TU44, **TJ4**/TU17, **TJ38**/Ch8, **TJ10**/Ch14/TU6/7). Typová jednotka TJ16 (P17, P21, P21 ENVI, P23 ENVI, P26 ENVI, CUL35, CUL44) je tvořena izoláty patřícími k druhu *Crithidia fasciculata*, **TJ21** (H10, H11, H18, H21, P59 - P64, SK03, G07, G58, G59, F19, F165, KYPR10) zastupuje izoláty shodné s druhem *Leptomonas pyrrocoris* a do **TJ40** (G32, G37) jsou zahrnuty izoláty příslušící k druhu *Crithidia luciliae thermophila*. Dále se na fylogenetických stromech vytvořilo několik samostatných typových jednotek zahrnujících izoláty pouze z ploštic (17 TJ českých, 13 TJ ghanských a 2 TJ italské). Typové jednotky vytvořené na základě sekvencí SSU rRNA – **TJ18** [P01, P05, P08, B481 (SSU)] a **TJ19** (P12) – spadají do blízkosti dosud nepopsaných druhů herpetomonád. Sesterskou linii k druhu *H. samuelpeessoai* je jednotka **TJ23** (P22) a k druhu *H. muscarum* je to jednotka **TJ09** (P31, P32). Některé potenciálně nové druhy

zahrnují izoláty jak z ploštic, tak i různých skupin dvoukřídlých: **TJ04** (P06 ENVI, P07 ENVI, P11 ENVI, P20 ENVI, P27 ENVI, P29 ENVI 1, P30 ENVI, P39 ENVI, G19, PHA1 T, K97), **TJ15** (P10, P14, P19, P28 ENVI, P29 (SL), P38 ENVI, P55 ENVI, G22, Ps29, PHA1 L, CUL43). U třech izolátů z ploštic byla odhalena shodnost s izoláty získanými z blech (dle fylogenetických stromů SL nebo SSU). Jedná se o izoláty P08 a B481 (**TJ18**), P13 a B873 (**TJ22**) a P08 a B466 (**TJ47**). Poslední jmenovaná jednotka byla odhalena na základě nesrovnalostí pozice izolátu P08 (z kultury) na stromech dle SSU a SL a dokládá tak současnou existenci několika druhů trypanosomatid v jedné kultuře. Zajímavý je izolát P47 (**TJ17**), který je podle environmentální sekvence genu SL i SSU blízce příbuzný druhu *Leptomonas costaricensis*.

Tab. 4.9 Přehled použitých sekvencí nepublikovaných v databázi GenBank

Izolát	SSU	gGAPDH	SL	Hostitel	Skupina <sup>1</sup>	Původ <sup>2</sup>
10VL	+	+		<i>Dysdercus obliquus or bimaculatus</i>	Het.	DM, HK
122AL	+	+	+	<i>Dysdercus obscuratus</i>	Het.	HK
124 AL	+		+	<i>Dysdercus obscuratus</i>	Het.	HK
12VL	+		+	<i>Dysdercus obliquus or bimaculatus</i>	Het.	HK
14BT	+	+		<i>Dysdercus lunulatus</i>	Het.	DM, HK
25EC	+	+		<i>Dysdercus sp. nymph</i>	Het.	DM
57VL		+	+	<i>Dysdercus obliquus or bimaculatus</i>	Het.	DM, HK
AsT3 tiplíci Austrálie			+	<i>Culicoides austropalpalis</i>	Cer.	ZG
AT2 tiplíci Anglie			+	<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
AT4 tiplíci Anglie			+	<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
AT6 tiplíci Anglie			+	<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
B06	+	+		<i>Ceratophyllus pullatus</i>	Siph.	ID
B0620	+	+		<i>Ceratophyllus pullatus</i>	Siph.	ID
B100	+	+		<i>Ceratophyllus sp.</i>	Siph.	ID
B1134 LiškaE	+			<i>Pulex irritans</i>	Siph.	ES
B125 Veverka	+	+		<i>Monopsyllus sciurorum</i>	Siph.	ES
B1267 Netopýr	+	+		<i>Nycteridopsylla eusarca</i>	Siph.	ES
B161 Hraboš	+	+		<i>Ctenophthalmus sp.</i>	Siph.	ES
B22 Hnízdo15	+	část		<i>Nosopsyllus fasciatus</i>	Siph.	ES
B376 Hlodavci	+			<i>Ctenophthalmus agyrtes</i>	Siph.	ES
B4	+	+		<i>Ceratophyllus sp.</i>	Siph.	ID
B466 Plch	+	+		<i>Monopsyllus sciurorum</i>	Siph.	ES
B471 Plch Trypanosoma	+	+		<i>Monopsyllus sciurorum</i>	Siph.	ES
B481 Plch	a	část a, b		<i>Monopsyllus sciurorum</i>	Siph.	ES
B55	+	+		<i>Ceratophyllus sp.</i>	Siph.	ID
B604 LiškaA	+	+		<i>Ctenocephalides canis</i>	Siph.	ES
B658 LiškaB		+			Siph.	ES
B66 Hraboš	+	+		<i>Ctenophthalmus assimilis</i>	Siph.	ES
B695 LiškaB	+			<i>Chaetopsylla globiceps</i>	Siph.	ES
B780 LiškaC	+			<i>Chaetopsylla globiceps</i>	Siph.	ES
B86	+	+		<i>Ceratophyllus sp.</i>	Siph.	ID
B864 LiškaC	+				Siph.	ES
B873 LiškaD	+	+		<i>Chaetopsylla globiceps</i>	Siph.	ES
BJ13 Jezevec	+	+		<i>Paraceras melis</i>	Siph.	ES
BJEŽ1 Ježek	+	+		<i>Monopsyllus sciurorum</i>	Siph.	ES
BK Kočka	+	+		<i>Ctenocephalides felis</i>	Siph.	ES
CTE	část a, b	a	b	<i>Ctenocephalides felis</i>	Siph.	ES
CUL 1 "Trypanosoma culicis"	AF416561	+		<i>Culex pipiens</i>	Cul.	JV
CUL 13	+	+		<i>Culex pipiens</i>	Cul.	ES + JV
CUL 26	+	+		<i>Culex modestus</i>	Cul.	JS + JV

Izolát	SSU	gGAPDH	SL	Hostitel	Skupina <sup>1</sup>	Původ <sup>2</sup>
Diptera 07 (Kostarika)	+	+	+	Calliphoridae	Bra.	HK
Diptera 08 (Kostarika)	+	+		Syrphidae	Bra.	HK
F115 ENVI			+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK
F165 (Francie)	+	+	+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK
F167 ENVI			+	<i>Stictopleurus punctatonervosus</i>	Het.	HK
F17 ENVI			+	<i>Corizus hyoscyami</i>	Het.	HK
F19 (Francie)	+	+	+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK
F221 (Francie)			+	<i>Scantius aegyptius rossii</i>	Het.	HK
F221 ENVI			+	<i>Scantius aegyptius rossii</i>	Het.	HK
F241 ENVI			+	<i>Maccevethus sp.</i>	Het.	HK
F248 ENVI			+	<i>Stictopleurus punctatonervosus</i>	Het.	HK
F46 ENVI			+	<i>Stictopleurus punctatonervosus</i>	Het.	HK
F98 ENVI			+	<i>Stictopleurus parumpunctatus</i>	Het.	HK
G01 ENVI			+	1	Het.	HK
G07	+		+	2	Het.	HK
G07 ENVI			+	2	Het.	HK
G09 ENVI			+	3	Het.	HK
G10 ENVI			+	3	Het.	HK
G13 ENVI			+	4	Het.	HK
G14 ENVI			+	5	Het.	HK
G15	+			6	Het.	HK
G15 ENVI			+	6	Het.	HK
G16 ENVI			+	7	Het.	HK
G19 ENVI			+	8	Het.	MJ
G20 ENVI			+	9	Het.	HK
G21 ENVI			+	10	Het.	HK
G22 ENVI			+	10	Het.	HK
G23 ENVI			+	11	Het.	HK
G24 ENVI			+	12	Het.	HK
G25 ENVI			+	3	Het.	HK
G29 ENVI			+	13	Het.	HK
G30	+			14	Het.	HK
G30 ENVI 1			+	14	Het.	MJ
G30 ENVI 2			+	14	Het.	MJ
G31 ENVI			+	13	Het.	HK
G32 ENVI			+	15	Het.	HK
G33 ENVI			+	16	Het.	HK
G34 ENVI			+	17	Het.	MJ
G35 ENVI			+	18	Het.	HK
G36 ENVI			+	19	Het.	HK
G37	+			20	Het.	HK
G37 ENVI			+	20	Het.	HK
G38 ENVI 1			+	21	Het.	MJ
G38 ENVI 2			+	21	Het.	MJ
G38 ENVI 3			+	21	Het.	MJ
G40 ENVI			+	23	Het.	HK
G41 ENVI			+	24	Het.	HK
G44 ENVI			+	26	Het.	HK
G45 ENVI			+	3	Het.	HK
G47 ENVI			+	28	Het.	HK
G48 ENVI			+	29	Het.	HK
G50 ENVI			+	30	Het.	MJ
G52 ENVI			+	31	Het.	HK
G53 ENVI			+	32	Het.	MJ
G54 ENVI			+	33	Het.	HK
G55 ENVI			+	34	Het.	HK
G57 ENVI			+	35	Het.	HK
G58	+	+	+	2	Het.	HK
G59	+		+	2	Het.	HK
G59 ENVI			+	2	Het.	HK
G60 ENVI			+	36	Het.	MJ

Izolát	SSU	gGAPDH	SL	Hostitel	Skupina <sup>1</sup>	Původ <sup>2</sup>
G61 ENVI 1			+	37	Het.	MJ
G61 ENVI 2			+	37	Het.	MJ
G62 ENVI			+	38	Het.	MJ
G63 ENVI 1			+	39	Het.	MJ
G63 ENVI 2			+	39	Het.	MJ
G64 ENVI 1			+	40	Het.	MJ
G64 ENVI 2			+	40	Het.	MJ
G65 ENVI 1			+	41	Het.	MJ
G65 ENVI 2			+	41	Het.	MJ
G66 ENVI 1			+	42	Het.	MJ
G66 ENVI 2			+	42	Het.	MJ
G66 ENVI 3			+	42	Het.	MJ
G67 ENVI 1			+	42	Het.	MJ
G67 ENVI 2			+	42	Het.	MJ
G68 ENVI			+	3	Het.	MJ
H10	+	+	+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK
H21 ENVI	+		+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK
CH278 Ch11 (China) Kultura <sup>3</sup>	+	+	GU063786	<i>Dysdercus poecilus</i>	Het.	HK
CH282 Ch11 (China) Kultura <sup>3</sup>	+	+	GU063787	<i>Dysdercus poecilus</i>	Het.	HK
CH334 Ch16 (China) Kultura <sup>3</sup>	+			<i>Iphita limbata</i>	Het.	HK, DM
CH395 Ch16 (China) Kultura <sup>3</sup>	+	+		<i>Melamphaus faber</i>	Het.	HK
K10 tiplíci	+			<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
K124 tiplíci			+	<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
K14 tiplíci	+			<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
K36 tiplíci	+		+	<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
K37 tiplíci	+		+	<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
K42 tiplíci			+	<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
K47 tiplíci	+			<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
K53 tiplíci			+	<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
K6 tiplíci	+		+	<i>Culicoides obsoletus</i>	Cer.	ZG
K73 tiplíci			+	<i>Culicoides pulicaris</i>	Cer.	ZG
KYPR01			+	<i>Scantius aegypti</i>	Het.	HK
KYPR06	+	+	+	<i>Scantius aegypti</i>	Het.	HK
KYPR10			+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK
KYPR12			+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK
<i>L. wallacei</i>		+				DM
P01	+			<i>Gerris gibbifer</i>	Het.	HK
P02 ENVI			+	<i>Dolycoris baccarum</i>	Het.	HK
P05	+			<i>Nabis brevis</i>	Het.	HK
P07 ENVI			+	<i>Closterotomus norwegicus</i>	Het.	HK
P08	+	+	+	<i>Nabis pseudoferus</i>	Het.	HK
P10	+			<i>Closterotomus norwegicus</i>	Het.	HK
P12	+	+	+	<i>Nabis limbatus</i>	Het.	HK
P13	+	+		<i>Nabis pseudoferus</i>	Het.	HK
P14	+	+	+	<i>Nabis rugosus</i>	Het.	HK
P15	+			<i>Nabis rugosus</i>	Het.	HK
P16	+			<i>Nabis brevis</i>	Het.	HK
P17	+	+	+	<i>Nabis brevis</i>	Het.	HK
P18	+	+	+	<i>Nabis brevis</i>	Het.	HK
P19	+		+	<i>Nabis brevis</i>	Het.	HK
P20 ENVI			+	<i>Lygus rugulipennis</i>	Het.	HK
P21	+	+	+	<i>Nabis pseudoferus</i>	Het.	HK
P21 ENVI			+	<i>Nabis pseudoferus</i>	Het.	HK
P23	+	+		<i>Rhynocoris iracundus</i>	Het.	HK
P23 ENVI			+	<i>Rhynocoris iracundus</i>	Het.	HK
P26 ENVI			+	<i>Capsus ater</i>	Het.	HK
P27 ENVI			+	<i>Liocoris tripustulatus</i>	Het.	HK
P28 ENVI			+	<i>Megaloceroea relicticornis</i>	Het.	HK
P29	+	+	+	<i>Stenotus binotatus</i>	Het.	HK
P29 ENVI 1			+	<i>Stenotus binotatus</i>	Het.	HK
P29 ENVI 2			+	<i>Stenotus binotatus</i>	Het.	HK

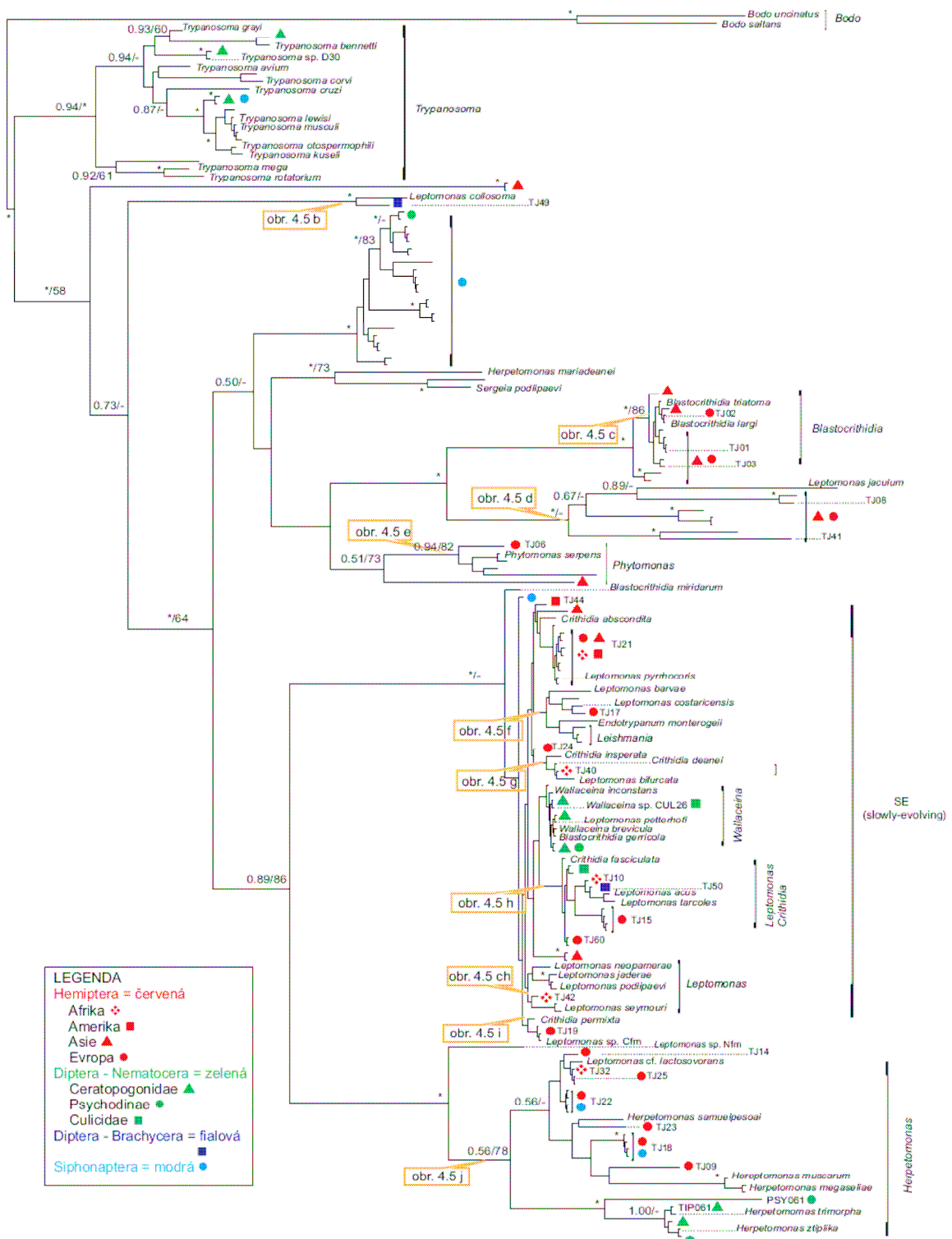
Izolát	SSU	gGAPDH	SL	Hostitel	Skupina <sup>1</sup>	Původ <sup>2</sup>
P29 ENVI 3			+	<i>Stenotus binotatus</i>	Het.	HK
P30 ENVI	+		+	<i>Calocoris affinis</i>	Het.	HK
P31	+	+		<i>Gerris odontogaster</i>	Het.	HK
P31 ENVI	+		+	<i>Gerris odontogaster</i>	Het.	HK
P32 ENVI			+	<i>Gerris odontogaster</i>	Het.	HK
P33 ENVI			+	<i>Scolopostethus thomsoni</i>	Het.	HK
P34 ENVI			+	<i>Scolopostethus thomsoni</i>	Het.	HK
P36 ENVI	+		+	<i>Coreus marginatus</i>	Het.	HK
P38 ENVI			+	<i>Nabis brevis</i>	Het.	HK
P39 ENVI			+	<i>Adelphocoris quadripunctatus</i>	Het.	HK
P40 ENVI	část		+	<i>Palomena prasina</i>	Het.	HK
P41 ENVI			+	<i>Eurygaster testudinaria</i>	Het.	HK
P42 ENVI			+	<i>Nepa cinerea</i>	Het.	HK
P47	+			<i>Picromerus bidens</i>	Het.	HK
P47 ENVI	+	+	+	<i>Picromerus bidens</i>	Het.	HK
P48 ENVI	+		+	<i>Dolycoris baccarum</i>	Het.	HK
P52 ENVI	+		+	<i>Kleidocerys resedae</i>	Het.	HK
P53 ENVI			+	<i>Kleidocerys resedae</i>	Het.	HK
P55	+	+		<i>Nabis rugosus</i>	Het.	HK
P55 ENVI			+	<i>Nabis rugosus</i>	Het.	HK
P56 ENVI	+		+	<i>Pentatoma rufipes</i>	Het.	HK
P57	+		+	<i>Eysarcoris aeneus</i>	Het.	HK
P57 ENVI			+	<i>Eysarcoris aeneus</i>	Het.	HK
P58 ENVI			+	<i>Eurydema dominulus</i>	Het.	HK
P59		+	+	<i>Pyrrhocoris marginatus</i>	Het.	HK
P63 ENVI			+	<i>Pyrrhocoris marginatus</i>	Het.	HK
P69 ENVI 1			+	<i>Oxycarenus lavatae</i>	Het.	HK
P69 ENVI 2			+	<i>Oxycarenus lavatae</i>	Het.	HK
P70 ENVI			+	<i>Eurygaster testudinaria</i>	Het.	HK
P71 ENVI			+	<i>Arma custos</i>	Het.	HK
Ps14 psychody	+			<i>Tinearia alternata</i>	Psy.	ZG
Ps29 psychody	+		+	<i>Logima</i> sp.	Psy.	ZG
Ps46 psychody	+		+	<i>Psycha grisescens</i>	Psy.	ZG
PSY 061	+			DNA z mixu psychod vzorek 061	Psy.	ES
Si15	+	+		<i>Rhynocoris</i> sp. (nymfa)	Het.	HK
Si17	+	+	+	<i>Apterola kuenckel</i>	Het.	HK
Si04			+	<i>Aquarius cinereus</i>	Het.	MJ
Si05			+	<i>Aquarius cinereus</i>	Het.	MJ
Si07 A			+	<i>Aquarius cinereus</i>	Het.	MJ
Si07 B			+	<i>Aquarius cinereus</i>	Het.	MJ
Si10			+	<i>Horvathiolus gibbicollis</i>	Het.	MJ
S23 tiplíci Petr Synek	+			<i>Culicoides pictipennis</i>	Cer.	ZG
SERG	+	+	+	<i>Dysdercus</i> sp.	Het.	HK
SK02 ENVI			+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK
SK03 ENVI			+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK
TIP 061	+			DNA z mixu tiplíků vzorek 061	Cer.	ES
TU-LS (Tunis)	+	+	+	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Het.	HK

<sup>1</sup> Hostitel: Het. – Heteroptera, Siph. – Siphonaptera, Cer – Ceratopogonidae, Cul. – Culicidae, Psy. – Psychodidae, Bra. – Brachycera

<sup>2</sup> Původ sekvence: HK – vlastní, DM – Dmitrij A. Maslov, MJ – Milan Jirků, ZG – Zdeňka Galková, ES – Eva Suková, ID – Iva Duží, JS – Jovana Sádlová a JV – Jan Votýpka

<sup>3</sup> Ch16 je nově ustanovená jednotka navazující na Ch1-Ch15 (Votýpka a kol., 2010), která není v publikovaném článku uvedena, protože se jedná o sekvence z kultur, které nebyly do článku zahrnuty. V rámci „envi“ vzorků se nepodařilo tuto typovou jednotku zachytit. V rámci této publikace byla již typová jednotka Ch11 popsána, zde se však jedná o sekvence z kultury.

Prázdná políčka znamenají chybějící údaje.

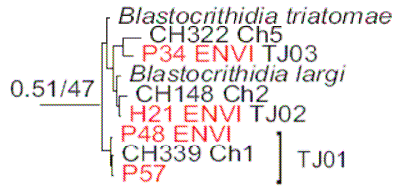


Obr. 4.5a Fylogenetický strom čeledi Trypanosomatidae zkonstruovaný na základě sekvencí SSU rRNA metodou MrB. Hodnoty bootstrapů byly získány metodami MrB/ML v uvedeném pořadí. Označení izolátů viz legenda. Jednotlivé detaily jsou uvedeny na obrázcích 4.5 b-j. Hodnoty rovné nebo větší než 0,95 (resp. 95) byly nahrazeny znakem „\*“, pokud statistická podpora byla menší než 0,50 (resp. 50) byl použit znak „+“. Pokud si topologie stromů neodpovídaly, byl použit znak „-“.

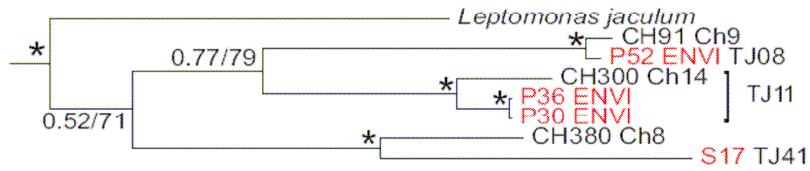




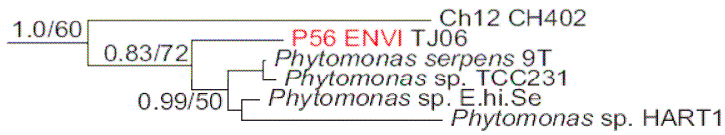
Obr. 4.5 b



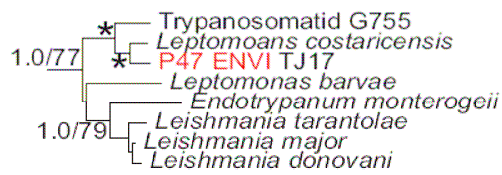
Obr. 4.5 c



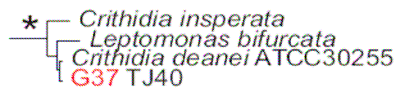
Obr. 4.5 d



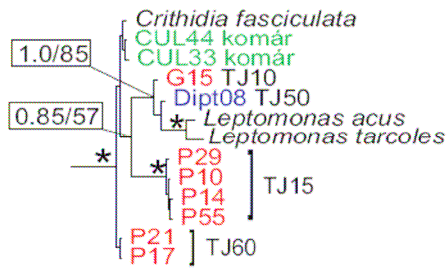
Obr. 4.5 e



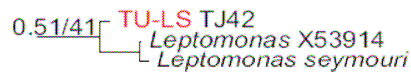
Obr. 4.5 f



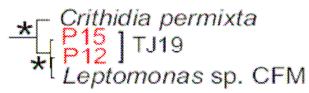
Obr. 4.5 g



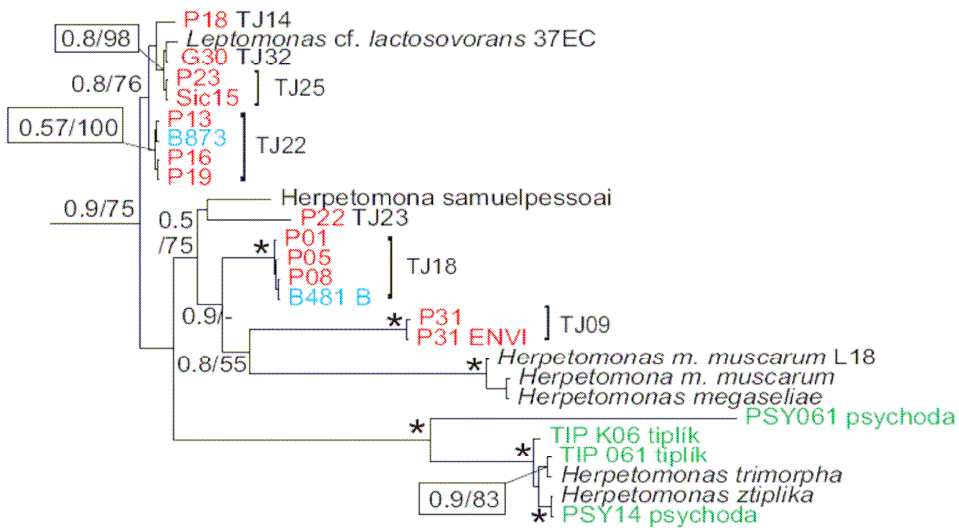
Obr. 4.5 h



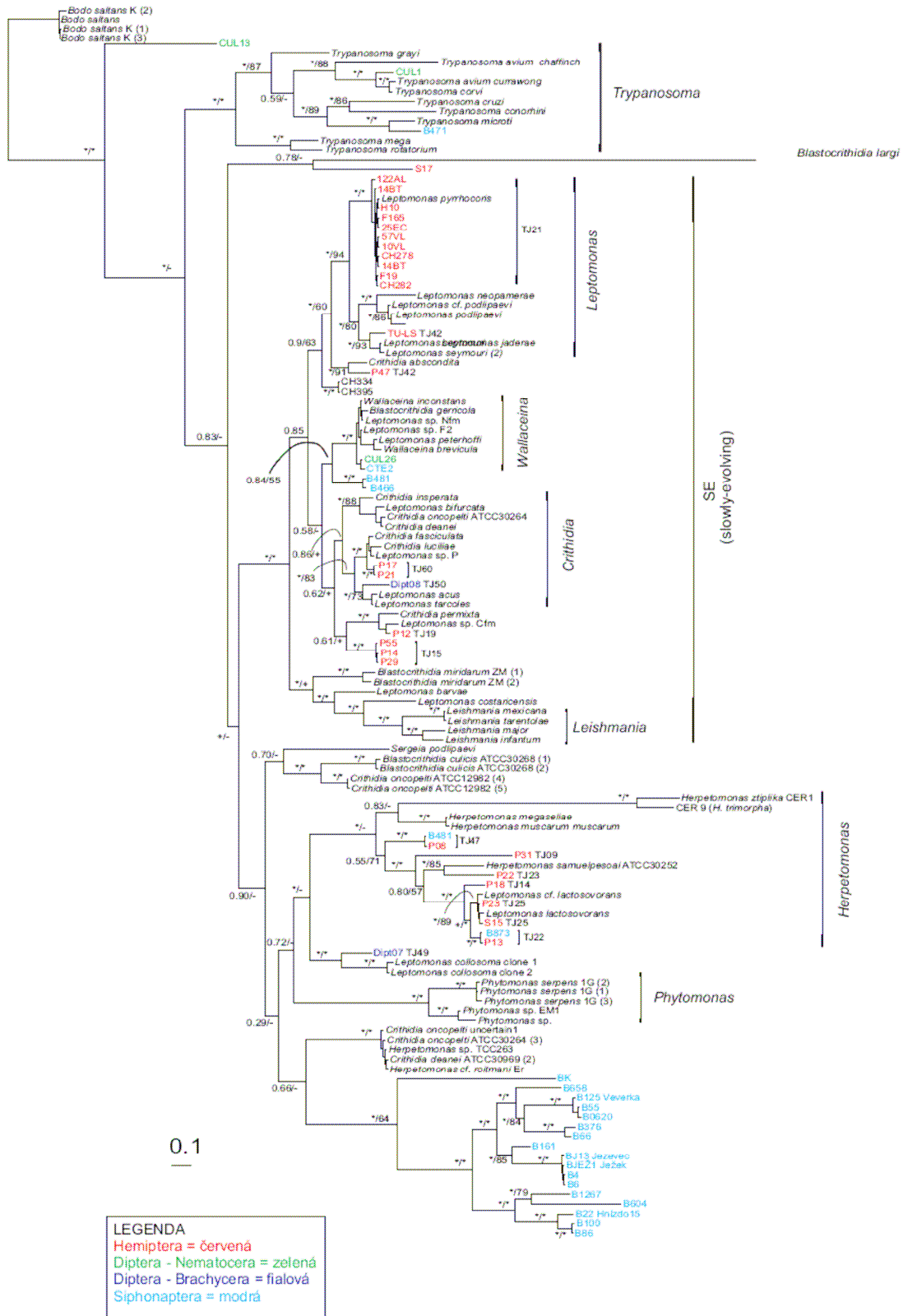
Obr. 4.5 ch



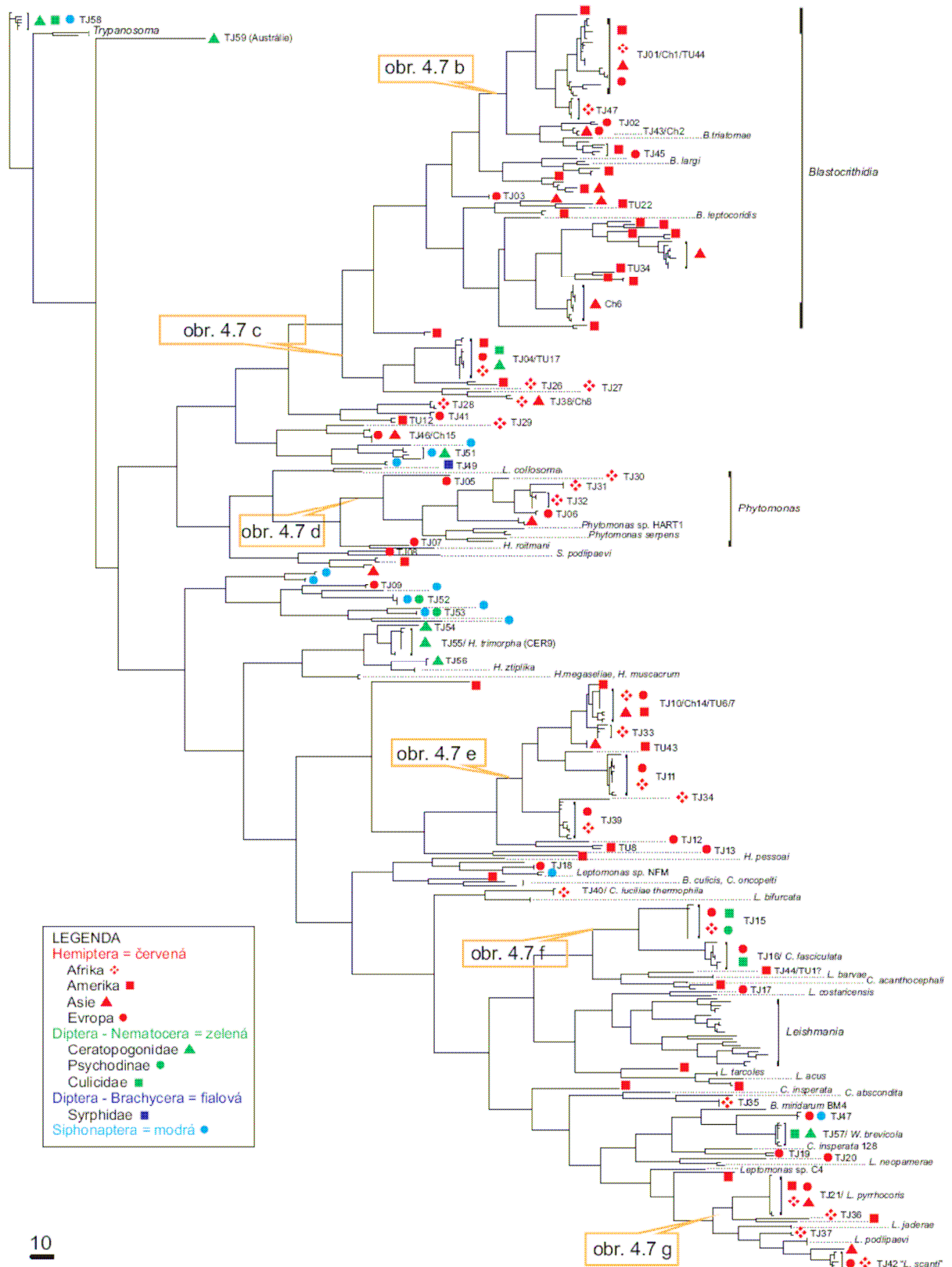
Obr. 4.5 i



Obr. 4.5 j

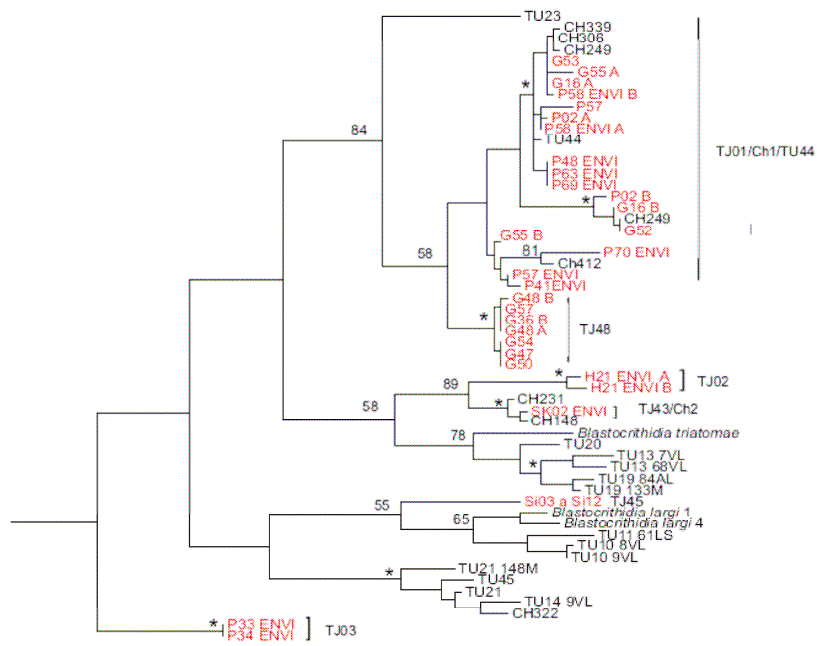


Obr. 4.6 Fylogenetický strom čeledi Trypanosomatidae dle sekvencí genu gGAPDH zkonstruovaný metodou MrB. Hodnoty bootstrapů byly získány metodami MrB/ML v uvedeném pořadí. Označení izolátů viz legenda. Hodnoty rovné nebo větší než 0,95 (resp. 95) byly nahrazeny znakem „\*“, pokud statistická podpora byla menší než 0,50 (resp. 50) byl použit znak „+“. Pokud si topologie stromů neodpovídaly, byl použit znak „-“.

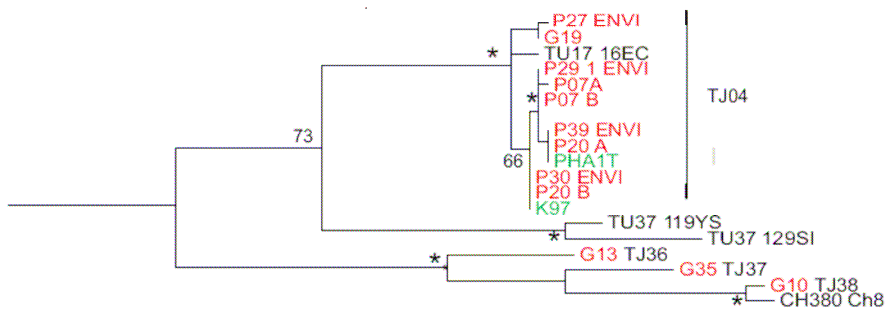


10

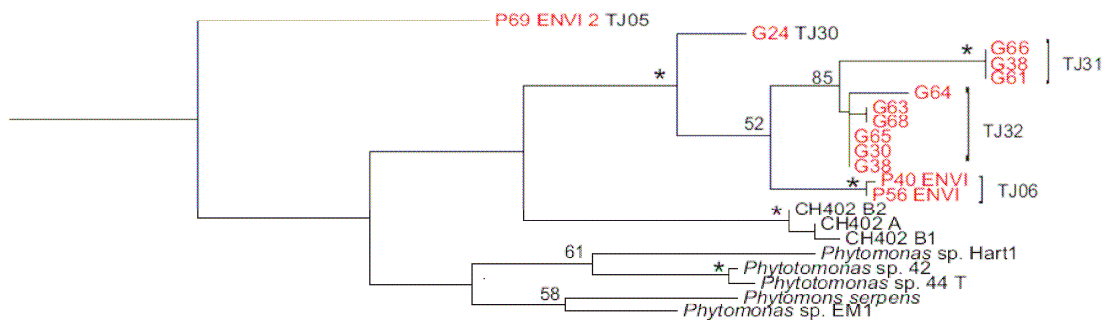
Obr. 4.7a Fylogenetický strom čeledi Trypanosomatidae zkonstruovaný dle sekvencí SL RNA metodou NJ. Hodnoty bootstrapů byly získány toutéž metodou. Hodnoty rovné nebo větší než 95 byly nahrazeny znakem „\*“, nižší hodnoty nebyly uváděny. Označení izolátů viz legenda. Jednotlivé detaily větví jsou zobrazeny na obrázcích 4.7 b-g.



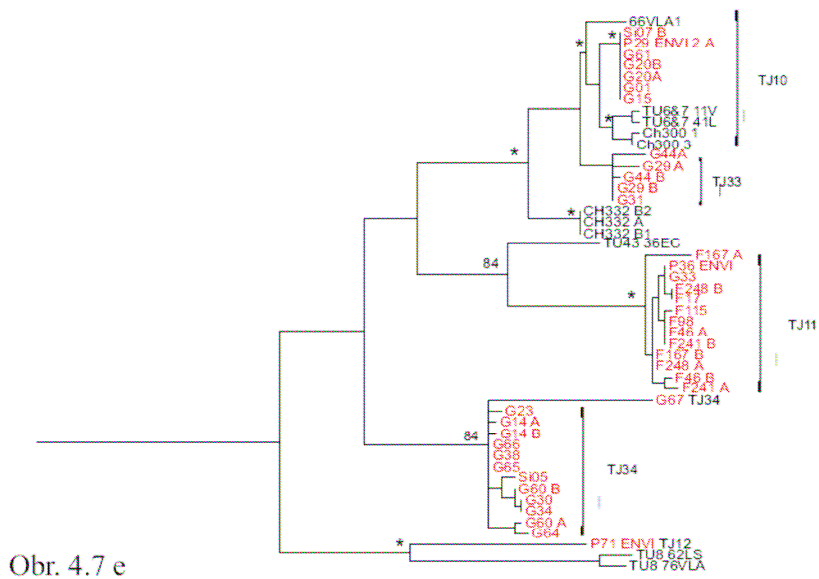
Obr. 4.7 b



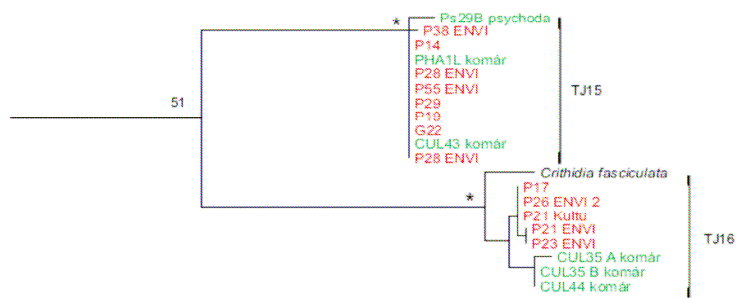
Obr. 4.7 c



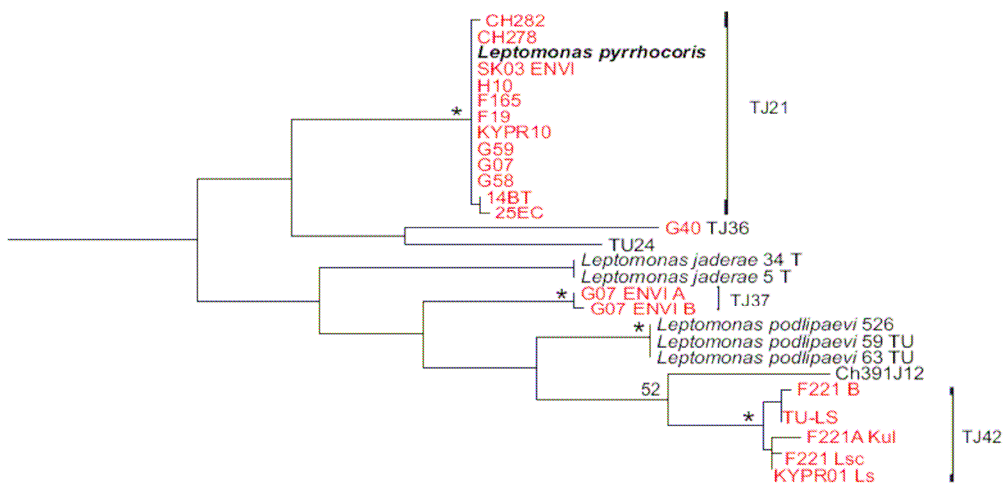
Obr. 4.7 d



Obr. 4.7 e



Obr. 4.7 f



Obr. 4.7 g

#### 4.4 Rozšíření a specifita druhu *Leptomonas pyrrhocolis*

V průběhu let 2007 – 2010 bylo mapováno geografické rozšíření a hostitelská specifita jednohostitelského druhu *Leptomonas pyrrhocolis*, který byl původně popsán z plošnice *Pyrrhocolis apterus* v Rumunsku (Wallace, 1966). Do výzkumu byly kromě ploštic druhu *Pyrrhocolis apterus* zahrnuty i příbuzné druhy a rody (*Dysdercus*, *Scantius*) ploštic z čeledi Pyrrhocolidae. Podařilo se nám získat řadu izolátů pocházejících z deseti zemí ze čtyř kontinentů (Evropa, Asie, Afrika a Amerika) (viz tabulka 4.10). V první fázi jsem mezi sebou porovnávala DNA z kultur metodou RAPD a velikosti produktu PCR (SL RNA) z kultur i z environmentálních vzorků. Vybrané typové izoláty byly následně analyzovány molekulárně-fylogenetickými metodami (sekvence pro geny SSU RNA, gGAPDH, SL RNA) a nakonec bylo provedeno srovnání morfologických znaků.

Bylo též zjišťováno, zda mohou plošnice z čeledi Pyrrhocolidae hostit i další druhy trypanosomatid. Z příbuzného druhu *Scantius aegyptius* odchyceného v severním Tunisku byl získán izolát nepodobný *L. pyrrhocolis*. Tento kultivovatelný izolát získal předběžné označení TU-LS (TJ42). Také izolát 124AL (TJ44) z Ekvádoru z plošnice *Dysdercus obscuratus* představuje nový druh trypanosomatida, který je dostupný v kultuře. Do kultury se dosud nepovedlo převést další izoláty, které byly zachyceny v plošticích z čeledi Pyrrhocolidae. Jde o izoláty H21 envi (TJ02), P63 envi (TJ08), SK02 envi (TJ43), F115 envi (TJ11), G07 envi (TJ37), 80MV envi (TU34), CH391 (Ch10) a CH392 (Ch4).

##### 4.4.1 Výsledky sekvenační a RAPD analýzy

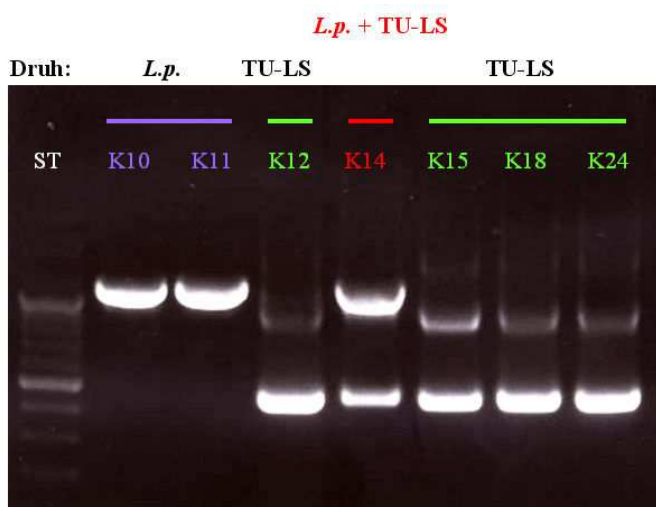
Metoda RAPD byla použita na kultivovatelné izoláty, které pocházely ze stejného hostitele a byly získány ve vyšším počtu. Tato multilokusová metoda nám pomohla efektivně porovnat celkový profil genomu daného organismu. Lze ji však použít jenom na DNA získanou z axenické kultury. Více kultur bylo získáno z českých, slovenských, kyperských a kostarických ploštic. Jejich genetický profil byl porovnán pomocí dvou nezávislých primerů OPE5 a OPE12. Jeden genotyp byl pozorován u českých a slovenských ploštic. U kyperských ploštic byly pozorovány dva genotypy – jeden odpovídá druhu *L. pyrrhocolis* a v druhém případě se jednalo o genotyp TU-LS. Výsledky RAPD analýzy však byly v jednom případě (KYPR14) zavádějící, z důvodu směsné kultury, která se tak jevila jako genotyp třetí (výsledky nejsou zobrazeny). Tento výsledek byl ověřen amplifikací SL RNA a porovnáním jejich velikostí (obr. 4.8).

U druhu *L. pyrrhocolis* nás zajímala vnitrodruhová variabilita ve vztahu ke geografickému původu získaných izolátů. Bylo proto provedeno srovnání izolátů z více geografických oblastí najednou. Zatímco evropské izoláty (získané ze tří druhů ploštic náležících do dvou rodů) byly téměř identické (obr. 4.9), u izolátů z amerických ploštic (přesně neurčený počet druhů rodu *Dysdercus* byla pozorována značná genetická diverzita (obr. 4.10 a 4.11).

Tab. 4.10 Přehled izolátů získaných z ploštic čeledi Pyrrhocoridae

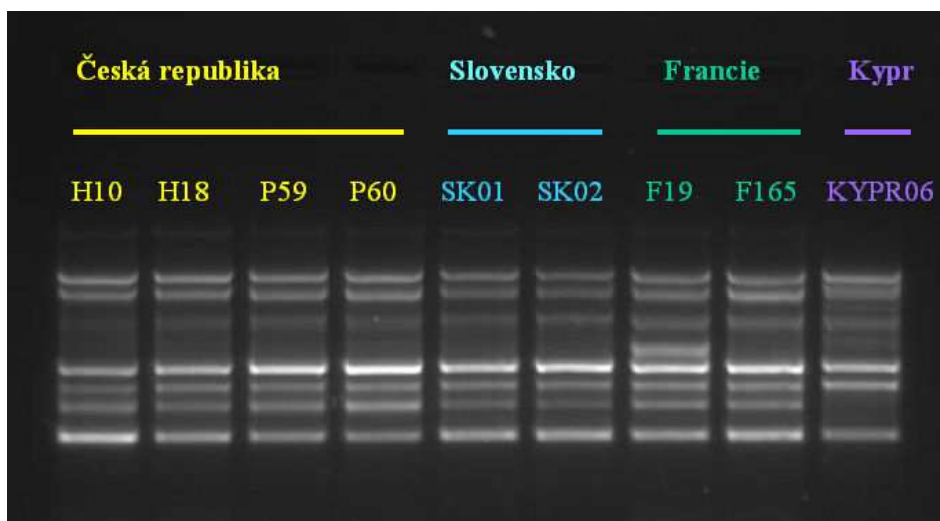
Lokalita	Druh hostitele	Izolát	Druh trypanosomatida (Typová jednotka)	Prevalence <sup>1</sup>	Původ
ČR (Čechy)	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	H10, H11, H18, H21	<i>L. pyrrhocoris</i> , H21 envi (TJ02)	21/6	vlastní
ČR (Morava)	<i>Pyrrhocoris marginatus</i>	P59 až P64	<i>L. pyrrhocoris</i> , P63 envi (TJ08 / Ch1 / TU44)	24/6	
Slovensko	<i>Pyrrhocoris marginatus</i>	SK01 až SK10	<i>L. pyrrhocoris</i> , SK02 envi (TJ43 / Ch2)	11/10	
Francie	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	F19, F20, F115, F165	<i>L. pyrrhocoris</i> , F115 envi (TJ11)	14/4	Votýpka
	<i>Scantius aegyptius rossii</i>	F220, F221, F222	TU-LS (TJ42)	13/3	
Kypr	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	KYPR09 až KYPR17	<i>L. pyrrhocoris</i> , TU-LS (TJ42)	13/10	vlastní
	<i>Scantius aegyptius</i>	KYPR01 až KYPR08, KYPR18 až KYPR24	<i>L. pyrrhocoris</i> , TU-LS (TJ42)	20/15	
Tunisko	<i>Scantius</i> sp.	TU	TU-LS (TJ42)	1/1	Votýpka
Ghana	<i>Dysdercus</i> sp.	G03 až G08, G58, G59	<i>L. pyrrhocoris</i> , envi (TJ37)	G07 20/19	
Burkina Faso	<i>Dysdercus</i> sp.	SERG	<i>L. pyrrhocoris</i>	?	Podlipaev
Ekvádor	<i>Dysdercus obscuratus</i>	122AL, 124AL	<i>L. pyrrhocoris</i> , 124AL (TJ44)	?	Maslov
Kostarika	<i>Dysdercus</i> sp.	14VL, 324RV, 325RV, 326RV, 329RV	<i>L. pyrrhocoris</i>	?	
	<i>Dysdercus obliquus</i> nebo <i>bimaculatus</i>	10VL, 12VL, 57VL	<i>L. pyrrhocoris</i>	?	
	<i>Dysdercus lunulatus</i>	14BT	<i>L. pyrrhocoris</i>	?	
	<i>Dysdercus</i> sp. (nymfa)	25EC, 28EC	<i>L. pyrrhocoris</i>	?	
	<i>Dysdercus flavolimbatus</i>	80MV	<i>L. pyrrhocoris</i> , 80MV envi (TU34)	?	
Čína	<i>Dysdercus poecilus</i>	CH278, CH282	<i>L. pyrrhocoris</i>	14/5	Votýpka
	<i>Melamphaus faber</i>	CH391, CH392	CH391 (Ch10), CH392 (Ch4)	14/5	

<sup>1</sup> Prevalence udává celkový počet vyšetřovaných ploštic ku infikovaným jedincům.

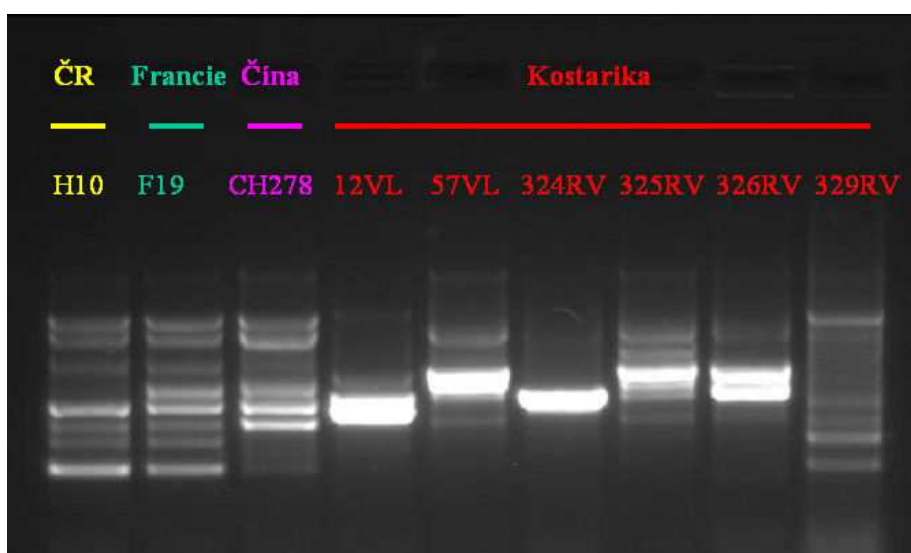


Obr. 4.8 Výsledek amplifikace genu *SL* RNA z kultur kyperských izolátů (název KYPRxx byl zkrácen na Kxx). V případě izolátu K14 se jedná o směsnou infekci. Standard: 3000, 2000, 1500, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100 bp

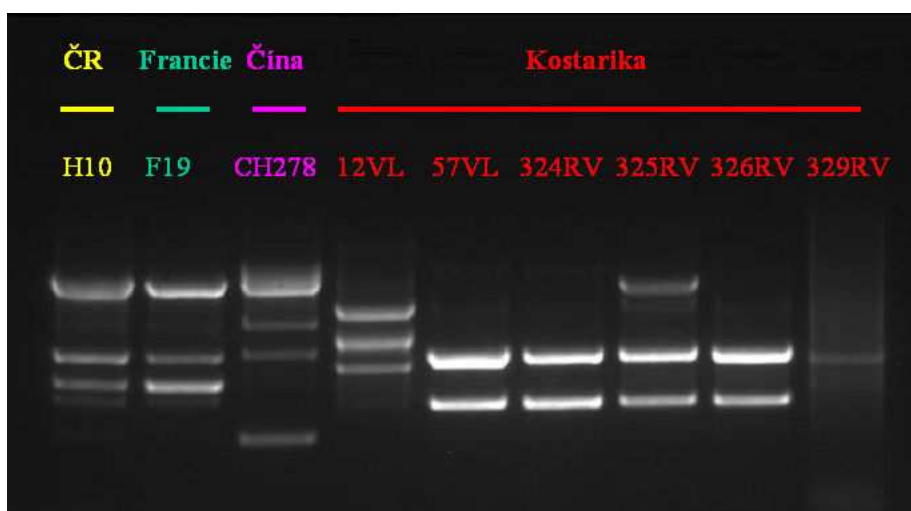




Obr. 4.9 Porovnání evropských izolátů druhu *L. pyrrhocoris* (primer *OPE5*)



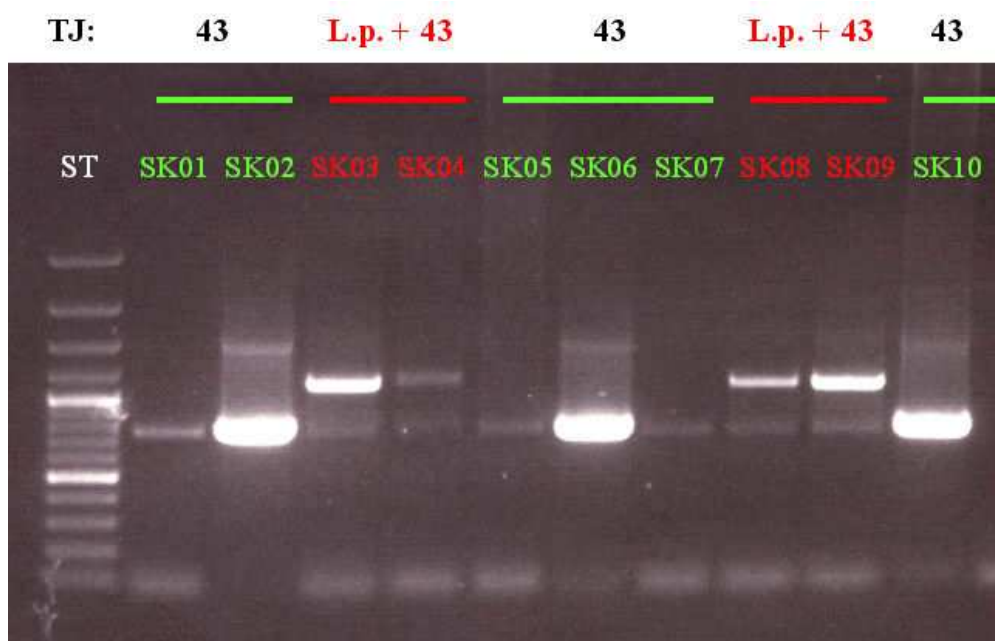
Obr. 4.10 Porovnání evropských, čínských a amerických izolátů druhu *L. pyrrhocoris* (primer *OPE5*)



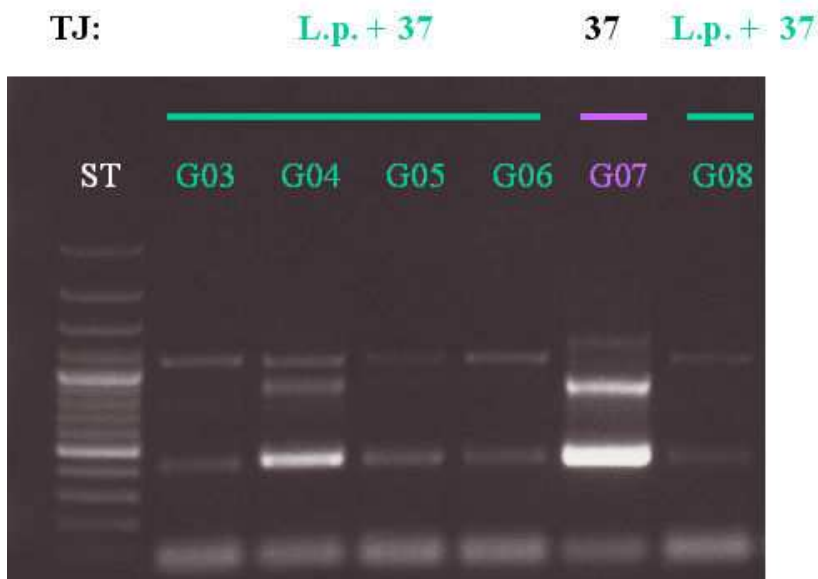
Obr. 4.11 Porovnání evropských, čínských a amerických izolátů *L. pyrrhocoris* (primer *OPE12*)

### Analýza environmentálních vzorků

Porovnání produktů PCR SL RNA u environmentálních vzorků napomohlo odhalit směsné infekce v původním hostiteli, které byly poměrně časté (obr. 4.12 a 4.13). Do kultury se téměř vždy povedlo převést druh *L. pyrrhocoris* a poměrně často i druh TU-LS, avšak kultivace dalších trypanosomatid byla vždy neúspěšná. Přehled nově zjištěných druhů u ploštic z čeledi Pyrrhocoridae je uveden v úvodní tabulce 4.10. Kromě dvou výše zmíněných druhů se u těchto ploštic vyskytovalo dalších osm druhů trypanosomatid, z nich tři byly zcela nové a pět patří k již popsaným typovým jednotkám z Ameriky a Číny (Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010). Zjistili jsme, že jedna populace ploštic může hostit i několik druhů trypanosomatid, které se dokonce mohou vyskytnout současně i v jednom hostitelském jedinci.



Obr. 4.12 PCR SL RNA environmentálních vzorků ze Slovenska získané z jedné populace ploštic *Pyrrhocoris apterus*. U červeně označených vzorků se nachází směsná infekce a u zeleně označených pouze jednotka SK02 (TJ43/Ch2) Standard: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

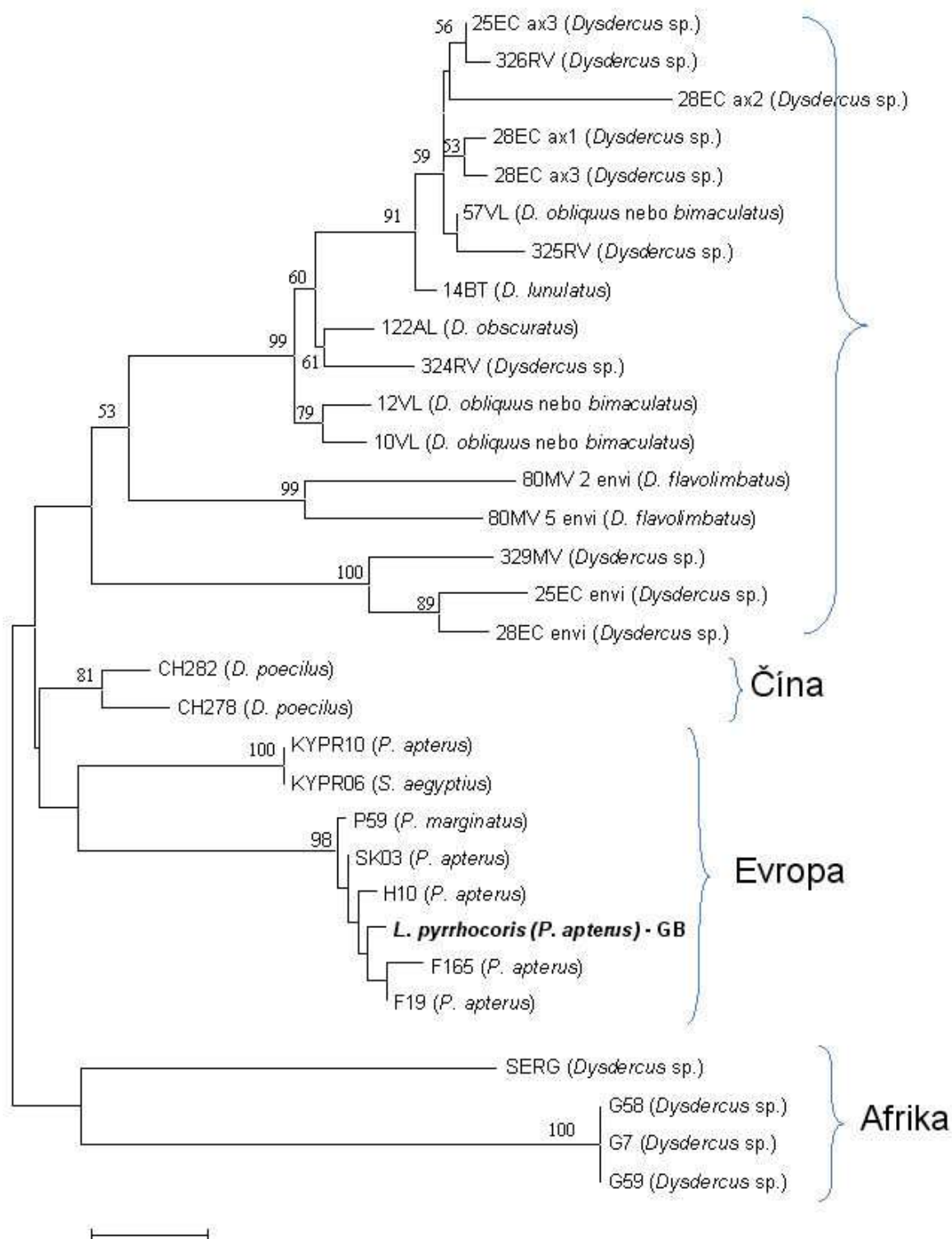


Obr. 4.13 PCR SL RNA environmentálních vzorků z Ghany z ploštic rodu *Dysdercus*. U zeleně označených vzorků se nachází směsná infekce. Standard: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

Na základě fylogenetických analýz sekvencí genu pro SSU, gGAPDH a SL vytvořily všechny izoláty příslušící k druhu *L. pyrrhocoris* (TJ21) získané z ploštic čeledi Pyrrhocoridae (TJ21) samostatnou statisticky dobře podpořenou větev umístěnou v rámci skupiny „SE“ (slowly evolving). Navíc se zjistilo, že tyto ploštice jsou schopny hostit více druhů trypanosomatid, z nichž některé nejsou nijak příbuzné s druhem *L. pyrrhocoris* a jsou rozmístěny v rámci celého fylogenetického stromu čeledi Trypanosomatidae. Podle analýzy celé sekvence genu pro SL RNA včetně hypervariabilní intergenové oblasti bylo prokázáno, že genotypová variabilita druhu koreluje s geografickým rozšířením (obr 4.14) a s největší variabilitou se setkáváme je mezi izoláty z Jižní Ameriky. Tento výsledek je ve shodě s analýzou RAPD.

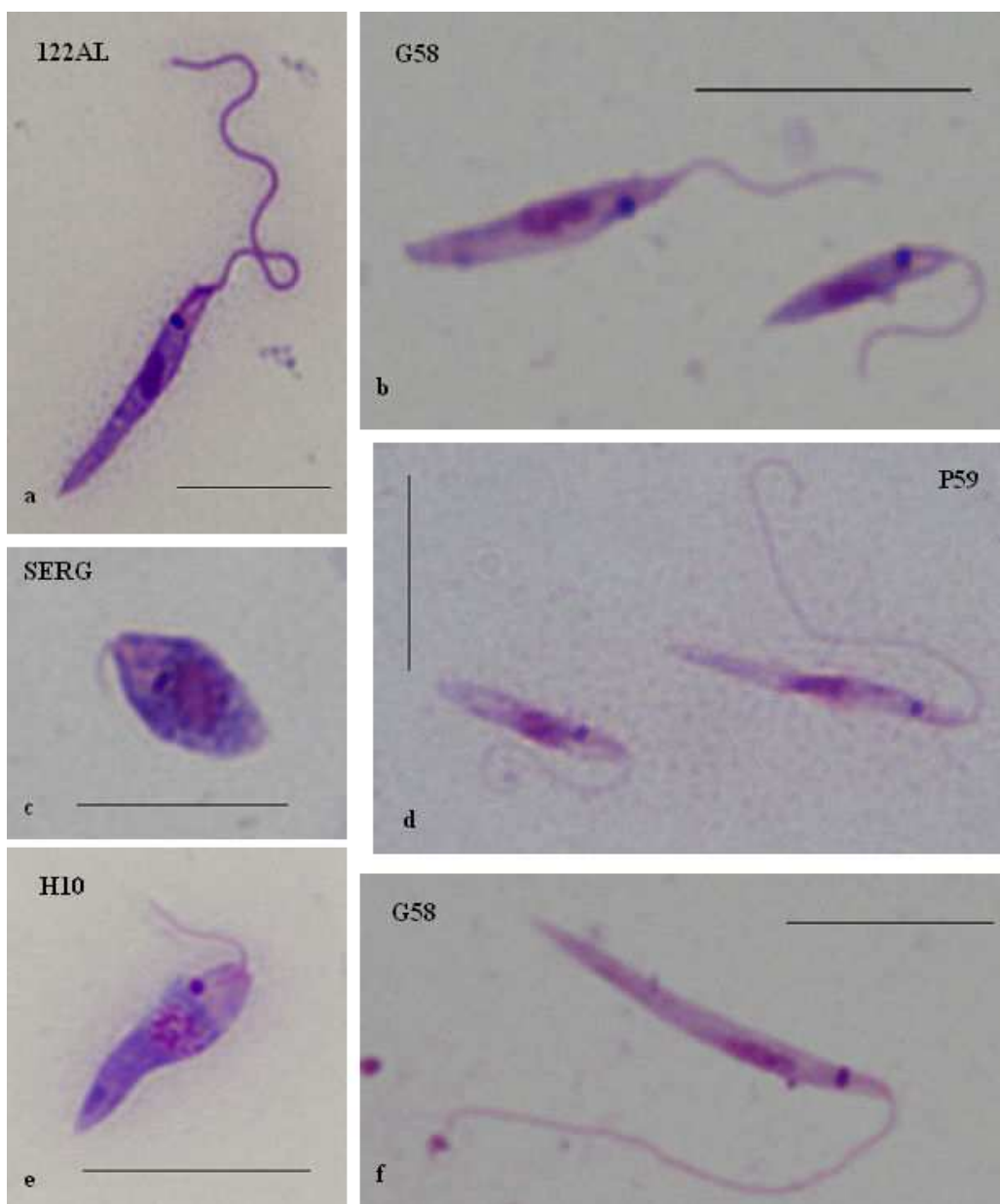
#### 4.4.2 Morfologie buněk

U vybraných izolátů příslušících do druhu *L. pyrrhocoris* byla provedena morfologická analýza buněk z kultury, a pokud to bylo možné, tak i u buněk získaných pitvou z původního hostitele. U buněk byla proměřena jejich délka, šířka, vzdálenost anteriorního konce buňky ke kinetoplastu i k jádru a délka bičíku. V případě, že byly dostupné preparáty původních buněk z hostitele, provedlo se porovnání s vykultivovanými buňkami. Morfologická stádia jsou zdokumentována i na elektronmikroskopických snímcích, kde byla sledována výška kinetoplastu, avšak ultrastruktura nebyla podrobněji studována (obr. 4.23 a).



Obr. 4.14 *Fylogenetický strom izolátů Leptomonas pyrrhocoris vytvořený z celé sekvence SL RNA (včetně hypervariabilní oblasti) pomocí metody MEGA minimum evolution. V závorkách jsou uvedena jména hostitelských ploštic.*

V kultuře i v hostiteli bylo pozorováno několik typů buněk (obr. 4.15). Jednak byly přítomny malé, střední a dlouhé, štíhlé promastigotní formy a dále pak choanomastigoti. I v rámci jedné kultury (resp. jedné pasáže) se vyskytovalo několik rozlišných morfotypů. V kulturách F19 a SERG byla pozorována přítomnost pouze jednoho typu buněk – malých zakulacených promastigotů (obr. 4.15 c). Ve zbylých kulturách byly přítomny dva až tři typy buněk – střední a velcí, štíhlí promastigoti (obr. 4.15 a,b,d,f). Občas se v těchto kulturách mohla objevit choanomastigotní forma (obr. 4.15 e) Mezi jednotlivými kulturami se parametry buněk lišily a to přesto, že se dbalo na stejné kultivační podmínky u všech izolátů.

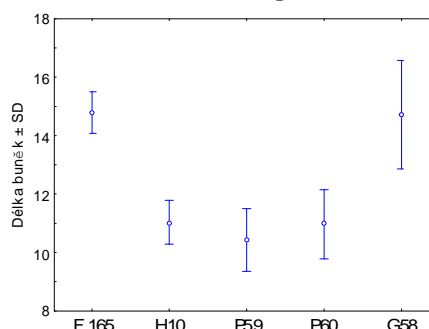


Obr. 4.15 Buňky z kultur *L. pyrrocoris*. Měřítko 10  $\mu\text{m}$

Ze statistického hodnocení byly vyloučeny izoláty s malým počtem naměřených buněk (G07 envi). Do analýz byly zahrnuty pouze buňky promastigotního typu. Na základě měření délky buněk u environmentálních vzorků byly izoláty rozděleny do dvou skupin (one-way ANOVA) (tabulka 4.11, obr. 4.16). Měření délky bičíku u environmentálních buněk také rozdělilo izoláty do dvou skupin (tabulka 4.12, obr. 4.17), avšak tyto skupiny nekorespondují se skupinami vytvořenými na základě měření délky buňky. Parametry šířka a vzdálenost anteriorního konce ke kinetoplastu/jádro se signifikantně liší mezi izoláty, ale nelze použít k rozřazení do skupin

Tab. 4.11 Analýza délky buněk z environmentálních vzorků (ANOVA post-hoc LSD test)

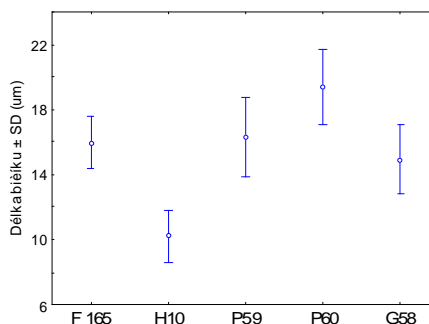
Izolát	Průměr [μm]	Sk.1	Sk.2
P59	10,43	****	
P60	10,97	****	
H10	11,02	****	
G58	14,7		****
F 165	14,79		****



Obr. 4.16 Analýza délky buněk z environmentálních vzorků (2 skupiny)

Tab. 4.12 Analýza délky bičíku u environmentálních vzorků (ANOVA post-hoc LSD test)

Izolát	Průměr [μm]	Sk.1	Sk.2
H10	10,22		****
G58	14,93	****	****
F 165	15,97	****	
P59	16,33	****	
P60	19,37	****	

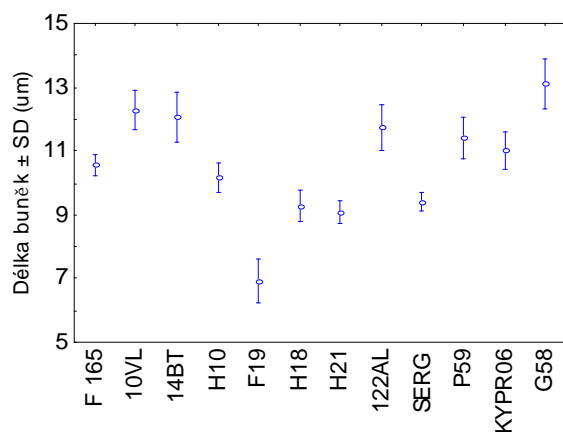


Obr. 4.17 Analýza délky bičíku buněk z environmentálních vzorků (2 skupiny)

U buněk z kultur se statisticky porovnávala šířka a délka buněk a délka bičíku. Na základě měření délky buněk byly jednotlivé izoláty rozřazeny do šesti skupin (tabulka 4.12, obr. 4.18), dle parametrů šířky buňky do pěti skupin (tabulka 4.13, obr. 4.19) a dle délky bičíku do šesti skupin (tabulka 4.14, obr. 4.20) Vzájemně si však tyto skupiny neodpovídají. Vzdálenosti anteriorního konce ke kinetoplastu/jádro se též signifikantně liší, ale nelze je použít k jednoznačnému rozřazení do skupin.

Tab. 4.12 Měření délky buněk z kultury (ANOVA post-hoc LSD test)

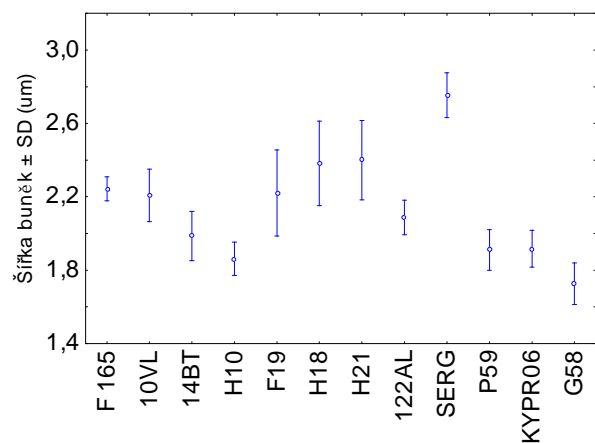
Izolát	Průměr [μm]	Sk.1	Sk.2	Sk.3	Sk.4	Sk.5	Sk.6
F19	6,92						****
H21	9,08	****					
H18	9,28	****					
SERG	9,41	****					
H10	10,16	****		****			
F 165	10,57	****		****	****		
KYPR06	11,01		****	****	****		
P59	11,41		****	****	****		
122AL	11,73		****		****		
14BT	12,09		****			****	
10VL	12,29		****			****	
G58	13,10					****	



Obr. 4.18 Analýza délky buněk z kultury (6 skupin)

Tab. 4.13 Analýza šířky buněk z kultury (ANOVA post-hoc LSD test)

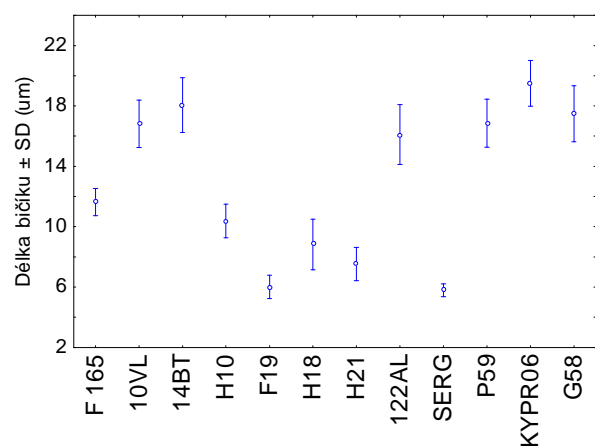
Izolát	Průměr [μm]	Sk.1	Sk.2	Sk.3	Sk.4	Sk.5
G58	1,73		****			
H10	1,86		****	****		
P59	1,91		****	****		
KYPR06	1,92		****	****		
14BT	1,99		****	****	****	
122AL	2,09	****		****	****	
10VL	2,21	****			****	
F19	2,22	****			****	
F 165	2,24	****			****	
H18	2,38	****				****
H21	2,4	****				****
SERG	2,75					****



Obr. 4.19 Analýza šířky buněk z kultury (5 skupin)

Tab. 4.14 Analýza délky bičíku buněk z kultury (ANOVA post-hoc LSD test)

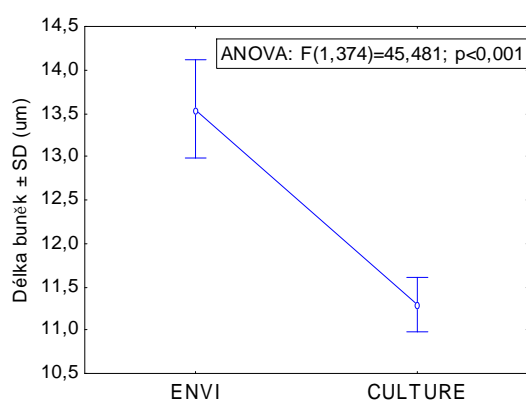
Izolát	Průměr [μm]	Sk.1	Sk.2	Sk.3	Sk.4	Sk.5	Sk.6
SERG	5,78		****				
F19	6,01		****				
H21	7,53		****	****			
H18	8,83			****	****		
H10	10,39				****	****	
F 165	11,63					****	
122AL	16,1	****					
10VL	16,82	****					
P59	16,86	****					
G58	17,48	****					
14BT	18,05	****					****
KYPR06	19,5						****



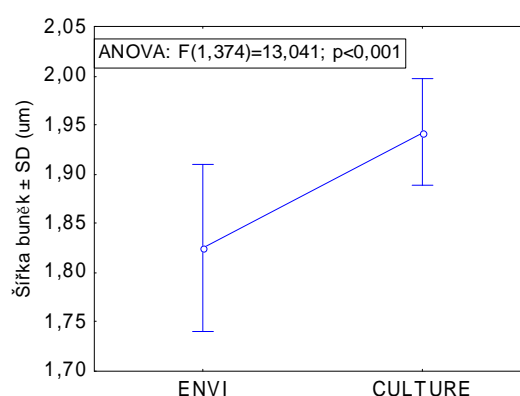
Obr. 4.20 Analýza délky bičíku u buněk z kultury (6 skupin)



Dále bylo provedeno porovnání buněk z kultury s environmentálními vzorky metodou Main effects ANOVA. To bylo možné pouze u izolátů, u nichž bylo změřeno dostatečné množství buněk (izoláty H10, P59, F165 a G58). Zjistili jsme, že při převodu buněk do kultury došlo k jejich k signifikantnímu ztluštění a zkrácení buněk (obr. 4.21 a 4.22). Signifikantně se též zkrátila u forem z kultury vzdálenost jádra k anteriornímu konci buňky ( $F_{(1,374)}=23,131$ ;  $p<0,001$ ) a vzdálenost kinetoplastu k anteriornímu konci buňky ( $F_{(1,374)}=19,046$ ;  $p<0,001$ ). Nesignifikantní bylo u buněk z kultury zkrácení bičíku ( $F_{(1,374)}=3,3586$ ;  $p=0,07$ ).



Obr. 4.21 Porovnání délky buněk v kultuře a v environmentálních vzorcích



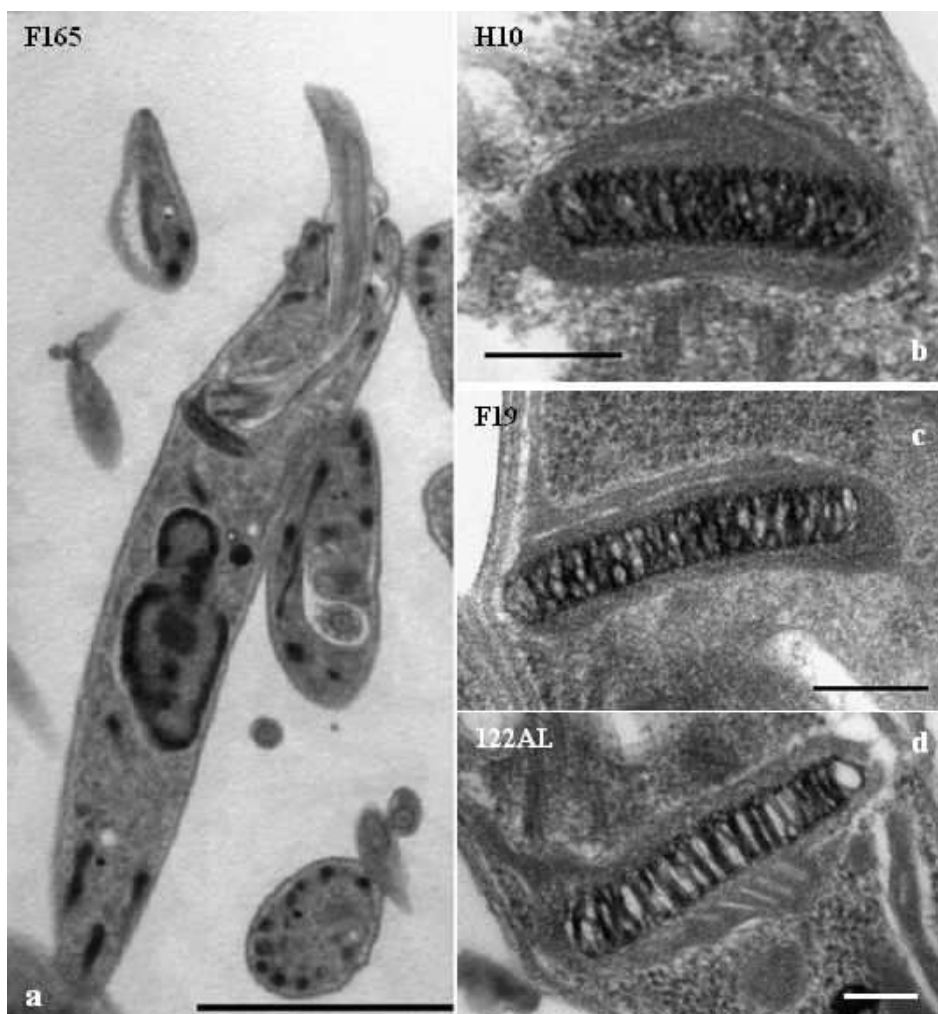
Obr. 4.22 Porovnání šířky buněk v kultuře a v environmentálních vzorcích

#### 4.4.3 Morfologie kinetoplastu

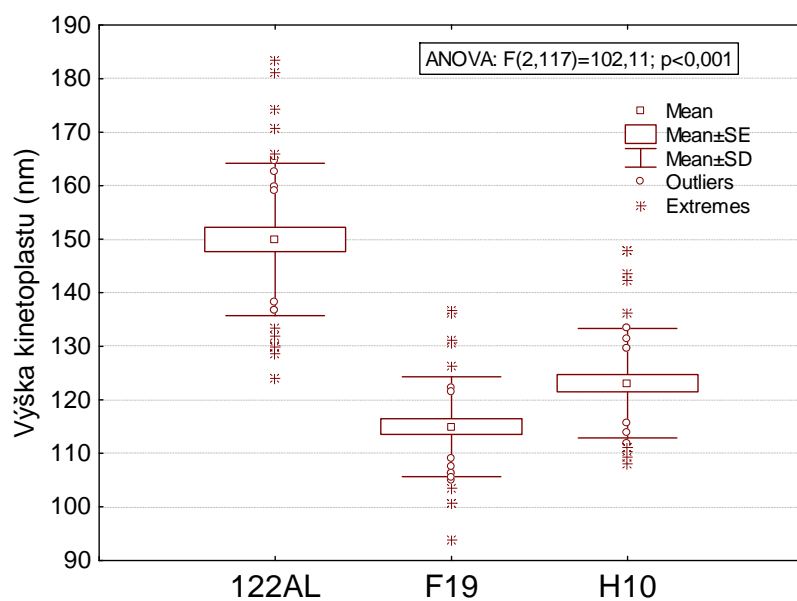
Na transmisním elektronovém mikroskopu byly pořízeny snímky kinetoplastů (40 buněk u každého ze tří vybraných izolátů), u kterých se následně měřila jejich šířka uprostřed a na obou koncích (obr. 4.23). Naměřené hodnoty byly analyzovány pomocí metody ANOVA. Bylo zjištěno, že se jednotlivé izoláty signifikantně liší ve výšce kinetoplastu a byly rozřazeny do tří skupin (tabulka 4.15, obr. 4.24).

Tab. 4.15 Rozdělení izolátů podle výšky kinetoplastu (ANOVA post-hoc LSD test)

Izolát	Průměr [nm]	Sk.1	Sk.2	Sk.3
F19	115	****		
H10	123		****	
122AL	150			****



Obr. 4.23 Elektronový snímek celé buňky a kinoplastů druhu *Leptomonas pyrrocoris*. Měřítka 2  $\mu$ m (a) a 200 nm (b,c,d)



Obr. 4.24 Analýza výšky kinoplastu u vybraných izolátů (3 skupiny)

## 5 DISKUZE

### 5.1 Trypanosomatida českých ploštic

V průběhu této studie bylo odchyceno přes 1200 ploštic z 27 čeledí. Celkem se jednalo o 110 druhů, přičemž na nejlépe prozkoumané lokalitě Předboř bylo získáno 76 druhů z 15 čeledí. Oblast Železných hor, ve které se tato lokalita nachází, je zatím z pohledu ploštic faunisticky nedotčené území. Přestože nebyly odchyceny žádné vzácné druhy ploštic, doplňují tyto odchyty jinak chybějící údaje kvadrátového mapování České republiky.

U ploštic byla zjištěna 6% prevalence nákazy jednohostitelskými trypanosomatidy (77 jedinců). Infikované ploštice byly s výjimkou dvou nymf vždy ve stádiu dospělce. Na rozdíl od řady předcházejících studií (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010) bylo v našem případě před pitvou nejdříve určeno pohlaví ploštice. Prevalence nákazy mezi pohlavími se výrazně nelišila (samice – 6,7 %, samci – 5,8 %) a toto zjištění je ve shodě s již dříve publikovanými výsledky (Tieszen a Molyneux, 1989b). Zjištěná hodnota celkové prevalence je značně nižší než prevalence zjištěná u ploštic na území Ekvádoru a Kostariky, kde činila 22 až 24 % (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007). Také v Číně (Votýpka a kol., 2010) zjištěná prevalence nákazy (16 %) je sice poněkud menší než v Jižní Americe, avšak stále podstatně vyšší než na našem území. Ve studii zaměřené pouze na fytofágní ploštice v Brazílii byla dokonce zjištěna až 57% prevalence (Batistoti a kol., 2001). Takovéto rozdíly by mohly být způsobeny rozdílným podnebím na daných lokalitách, které by mohly ovlivnit přenos jednohostitelských trypanosomatid a tedy i prevalenci. Většina předchozích studií totiž proběhla v tropech a subtropích, kde se hmyz nemusí potýkat se zimní diapauzou, a proto zde může být ulehčen přenos parazitů mezi hostiteli. Také se v těchto oblastech (tropický ekosystém) vyskytují mnohem komplexnější potravní vztahy, v rámci kterých mohou trypanosomatida snadněji kolovat. Zjištěná vysoká prevalence v brazilské studii by mohla být způsobena svou jednostranností, kdy se autoři zaměřili pouze na určité čeledi. Je totiž zřejmé, že některé čeledi ploštic vykazují vyšší míru nákazy.

Na českém území patří mezi čeledi s nejvyšší prevalencí Nepidae (100 %), Pyrrhocoridae a Oxycarenidae (27 %), Lygaeidae (13 %), Pentatomidae (7 %) a Nabidae (7 %). U ostatních čeledí, u kterých byla zjištěna přítomnost trypanosomatid, se prevalence pohybovala do 5 % (Gerridae, Reduviidae, Rhopalidae, Rhyparochromidae, Scutelleridae, Coreidae a Miridae). Vysoká prevalence u splešťulí (Nepidae) však mohla být způsobena náhodou, jelikož bylo vyzkoušeno pouze pět kusů a u všech byla pozorována infekce trypanosomatidy. Nebo by se mohlo jednat o druh ploštice extrémně náchylného k nákaze

těmito parazity. Také se musí uvážit skutečnost, že na PCR SL RNA environmentálních vzorků bylo na elektroforetogramu přítomno několik proužků odpovídající několika druhům trypanosomatid, které ovšem mohly pocházet z potravy ploštic.

U zbývajících 14ti čeledí nebyla trypanosomatida pozorována vůbec, i když je nutné poznamenat, že počet jedinců náležících k těmto čeledím byl velmi nízký (viz. obr. 4.1) a nepřítomnost trypanosomatid byla patrně způsobena nedostatečným počtem vyšetřených vzorků. Vypitvá-li se tedy dostatečný počet kusů, bude každá čeleď pozitivní. Pokud nahlédneme do novodobých studií zaměřených na výskyt trypanosomatid u ploštic, udávaná prevalence v rámci studovaných čeledí se může značně lišit. Jako příklad může posloužit čeleď Pyrrhocoridae, u které byla zjištěna nakaženost 15 % v Brazílii (Batistoti a kol., 2001), 35 % v Číně (Votýpka a kol., 2010) a až 86 % v Ekvádoru (Maslov a kol., 2007). Byly vysledovány i jisté změny v hodnotách prevalence v průběhu roku, kdy byla v jarním období nejvyšší (75 %) a naopak nejnižší na podzim (36 %) (Sbravate a kol., 1989). Mezi nejčastěji parazitované čeledi jistě patří již zmiňovaná čeleď Pyrrhocoridae a dále pak Pentatomidae, Miridae, Coreidae, Lygaeidae, Largidae, Gerridae a Rhopalidae (Sbravate a kol., 1989; Batistoti a kol., 2001; Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010). Ve studiích z Asie a Číny nebyla nákaza zjištěná u ploštic z čeledi Nabidae, i když v České republice patří tato čeleď naopak mezi poměrně často parazitovanou skupinu ploštic. Také v Rusku bylo z těchto ploštic izolováno několik blíže neurčených trypanosomatid a tamtéž byl z *Nabis brevis* popsán jeden druh rodu *Wallaceina* – *W. brevicula* (Podlipaev, 1990; Podlipaev a kol., 2004a). Naopak u některých čeledí dosud stále nebyla popsána přítomnost těchto parazitů, což by mohlo být způsobeno odolností vůči infekci trypanosomatidy, odlišnou ekologií a nebo nedostatečným sběrem vzorků, jelikož méně obvyklé druhy ploštic nebo druhy, jejichž sběr je poněkud náročnější a je k němu třeba jistých znalostí o jejich biologii, nemusely být do průzkumů dosud zařazeny.

## 5.2 Kultivace trypanosomatid

Ze 77 zjištěných nálezů trypanosomatid u ploštic bylo do kultury převedeno pouze 29 izolátů, což činí 37% úspěšnost. Podobné výsledky byly zjištěny i u kultivace jednohostitelských trypanosomatid z blech (40 %) (Suková, 2009). Westenberger a kol. (2004) popisují úspěšné převedení do kultury v 50 % případů, z toho u 33 případů neúspěšné kultivace byl u 24 pozorován růst buněk v primární kultuře, avšak nepovedlo se je dále přenést do následujících pasáží. Autoři se proto domnívají, že použití komplexnějšího média (např. LIT médium s fetálním bovinním sérem) by mohlo podmínky pro přežití bičíkovců zlepšit (Westenberger

a kol., 2004). I když při naší práci bylo používáno komplexní médium, pravděpodobnost vykultivování se nezvýšila.

Námi vykultivované izoláty se ocitly na fylogenetickém stromě nejčastěji v blízkosti crithidií, leptomonád, herpetomonád a wallacein. Právě rody *Crithidia* a *Leptomonas* bývají často identifikovány v kulturách pocházejících z ploštic (Batistoti a kol., 2001; Westenberger a kol., 2004). Naše typová jednotky **TJ15** (P10, P14, P29 a P55) a **TJ24** (P47) jsou sesterské k již popsaným druhům leptomonád, avšak (kromě P47) se jedná o příbuznost s druhy *L. tarcoles* a *L. acus*, které jsou blízce příbuzné crithidiím a k rodu *Leptomonas* byly přiřazeny pouze na základě morfologie (Yurchenko a kol., 2008). V blízkosti crithidií se ocitly i izoláty z typových jednotek **TJ19** (P12, P15), **TJ16** (P17 SL, P21 SL) a **TJ60** (P17 SSU, P21 SSU). Izoláty z **TJ21** (P59 až P54, H10, H11, H18, H21) byly přiřazeny k ruhu *Leptomonas pyrhhocoris*, který je velmi dobře kultivovatelný. Rod *Herpetomonas* je naopak častým parazitem dvoukřídlých (Podlipaev, 1990). V plošticích byl objeven dosud spíše náhodně a jeho přítomnost v tomto typu hostitele bývá vysvětlována predací (Carvalho a Deane, 1974). Stejně tak je tomu i u našich kultur herpetomonád [**TJ09** (P31), **TJ14** (P18), **TJ18** (P01, P05, P08 SSU), **TJ22** (P13, P16, P19), **TJ25** (P23)], které pochází z dravých druhů ploštic (Nabidae a Reduviidae). Izolát P08 (**TJ47**) náleží k rodu *Wallaceina*, u kterého byla prokázána rychlá schopnost množení v kultuře a v případech směsné infekce může záhy přerůst původní druh pozorovaný v ploštici (Merzlyak a kol., 2001). Jeden kultivovatelný izolát P57 (**TJ01/Ch1/TU44**) byl na základě fylogenetických analýz zařazen do blízkosti druhu *Blastocrithidia triatoma*. Druhy patřící do rodu *Blastocrithidia* nebývají přítomny v kulturách získaných z ploštic (Sbravate a kol., 1989; Batistoti a kol., 2001; Westenberger a kol., 2004), přesto že se v tomto typu hostitelů běžně nacházejí (Votýpka a kol., 2010). Právě rod *Blastocrithidia* patří k těm nejproblematičtějším z pohledu kultivovatelnosti, a i v našem výzkumu náleželo na základě fylogenetických analýz do tohoto rodu 13 nekultivovatelných izolátů [**TJ01** (P02, P04, P41, P48, P49, P57, P58, P63, P69, P70), **TJ02** (H21), **TJ03** (P33, P34)] Ve snaze osekvenovat gen pro gGAPDH z axenické kultury izolátu P57 (**TJ01/Ch1/TU44**) jsme nebyli úspěšní. Sekvence opakovaně odpovídaly bakteriálnímu genu a je tedy možné, že tento druh obsahuje endosymbiotickou bakterii. Pak by však jeho pozice na fylogenetickém stromě neodpovídala skutečnosti, že endosymbionty obsahující trypanosomatida tvoří samostatnou monofyletickou větev (Du a kol., 1994b). Toto naše zjištění vyžaduje další šetření.

Selhání kultivace v ostatních případech mohlo být způsobeno vyšší náročností některých druhů trypanosomatid na kultivaci, vyžadujících specifické podmínky pro svůj růst

a množení. Dále pak přítomností kontaminace, která může omezit růst parazita. U několika izolátů pokus o kultivaci selhal, i když v hostiteli byla pozorována vysoká parazitémie, naopak část vzorků se podařilo vykultivovat i přesto, že v hostiteli nebylo přítomno mnoho bičíkovců. Nedá se tedy říci, že existuje jakási prahová hranice počtu buněk nutných pro úspěšnou iniciaci kultivace.

Vzhledem ke skutečnosti, že není možné vykultivovat všechny izoláty z pozitivních nálezů, je vhodné použití molekulárně-biologických metod nevyžadující buňky z kultury. Rodovou příslušnost řady nekultivovatelných izolátů je velmi těžké určit, se na fylogenetickém stromě vyskytují v blízkosti dosud nepopsaných typových jednotek z Jižní Ameriky nebo Číny (Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010). Výjimku tvoří několik izolátů: typové jednotky **TJ06** (P40, P56) a **TJ05** (P69 ENVI 2) nacházející se na větvi tvořené druhu rodu *Phytomonas*, u kterého byla již dříve popsána problematičtá kultivace (Batistoti a kol., 2001); P42 (**TJ20**) v blízkosti druhu *L. neopamerae* a P47 ENVI (**TJ17**) v blízkosti druhu *L. costaricensis*. Izolát P42 (**TJ20**) pochází z ploštic *Nepa cinerea*, ze které byly získány další čtyři izoláty, avšak ani u nich se kultivace nezdařila. Je tedy možné, že trypanosomatida v tomto druhu ploštic jsou těžko kultivovatelná, i když ve střevě bylo přítomno velké množství bičíkovců. Nekultivovatelné izoláty P29 ENVI 2 (**TJ10**), P30 a P36 (**TJ11**) a P71 (**TJ12**) se vyskytují na fylogenetické větvi tvořené dosud nepopsanými typovými jednotkami TU8, TU43, TU6/7/Ch14, Ch13. V blízkosti *H. roitmani* je umístěn izolát P53 (**TJ07**) a sesterskou větví k druhu *S. podlipaevi* je P52 (**TJ08**). Oba tyto izoláty (P52 a P53) pochází z ploštic *Kleidocerys resedae*, které vykazovaly jen nízkou parazitémii, což se mohlo projevit na výsledku kultivace.

Aniž bychom potřebovali trypanosomatida v kultuře můžeme skutečnou diverzitu prozkoumat pomocí metody navržené Westenbergem a kol. (2004) zahrnující amplifikaci genu SL RNA z environmentálních vzorků, případně z těchto vzorků sekvenovat i gen pro SSU (Votýpka a kol., 2010).

### 5.3 Lokalizace infekce v plošticích

Přesná lokalizace infekce nebývá často uváděna, i když jsou tyto údaje významné pro objasnění cesty přenosu trypanosomatid. Nejčastěji se trypanosomatida nachází v zažívací soustavě ploštic. Studie provedené u fytofágních druhů ploštic ukazují, že tito parazité se nacházejí pouze v zažívací soustavě v téměř 68 % případů. Dále se bičíkovci mohou nacházet současně v trávicím traktu a slinných žlázách nebo v hemolymfě (23 – 29 %). Případů, kdy se trypanosomatida nachází pouze ve slinných žlázách, bylo popsáno nejméně (Sbravate a kol.,

1989; Godoi a kol., 2002). Při vyšetřování čínských ploštic na přítomnost bičíkovců byla pitva provedena takovým způsobem, aby se dal zjistit přesný výskyt v rámci zažívacího traktu (Votýpka a kol., 2010). Většina infekcí (97 %) byla lokalizována ve středním střevě (mesenteron) především v jeho abdominální části, zatímco zadní část střeva (proktodeum) byly napadány výjimečně (2 případy). Malphigické trubice mohou být také infikovány, ale též se jednalo o výjimky (2 případy). Slinné žlázy nebyly pitvány.

Rovněž při pitvách českých ploštic byla zjišťována přesná lokalizace trypanosomatid v zažívacím traktu. Ostatní orgány (např. slinné žlázy) nebo hemolymfa nebyly na přítomnost bičíkovců vyšetřovány. Přesné místo infekce nebylo možné určit u 36 % pozitivních nálezů, které vykazovaly nízkou parazitěmií. V těchto případech muselo nejdříve dojít k roztlaku střeva, aby bylo možné parazity vůbec detekovat. Pokud by se postupovalo jako v případě čínských ploštic, kdy se jednotlivé části střeva od sebe oddělily a vyšetřovaly se samostatně (Votýpka a kol., 2010), nemusel by být roztlak střeva překážkou ke zjištění místa infekce. U ostatních pozitivních nálezů, kdy se lokalizaci parazitů podařilo zjistit, se trypanosomatida vyskytovala ve třetině případů pouze v zadním střevě (proktodeum). Druhou třetinu tvořily infekce přítomné pouze ve středním střevě (mesenteron). Zpravidla u silných infekcí byli paraziti přítomni jak ve středním tak v zadním střevě současně (zbývající třetina případů). Stejně tak jako v případě čínských ploštic (Votýpka a kol., 2010), byla infekce v Malphigických trubicích zjištěna jen výjimečně (pozorován jeden případ infikované *Gerris odontogaster*). Z těchto výsledků se bohužel nedá vyvodit závislost mezi mírou a lokalizací infekce na hostitelském druhu nebo čeledi ploštice.

#### **5.4 Fylogenetické analýzy**

Fylogenetické stromy byly zkonstruovány na základě sekvencí tří genů (SSU rRNA, gGAPDH a SL RNA). Tyto sekvence byly získány z buněk přítomných v kultuře, z environmentálních vzorků jsme získali sekvence pro SL RNA a v některých případech se podařilo získat i sekvenci SSU rRNA. Charakterizace českých, francouzských, sicilských a ghanských environmentálních vzorků byla provedena pomocí molekulárně-biologických metod použitých s úspěchem při průzkumu diverzity jednohostitelských trypanosomatid na území Kostariky, Ekvádoru a Číny (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010). Stalo se, že několik SL sekvencí nebylo smysluplných a nemohly tak být zařazeny do fylogenetických analýz. Zřejmě v těchto případech došlo k amplifikaci a osekvenování jakéhosi pseudogenu.

Jednotlivé izoláty z ploštic jsou roztroušeny na různých větvích v rámci celého fylogenetického stromu a nevykazují tedy tendenci vytvářet monofyletickou skupinu v závislosti na hostiteli. Získané ploštičí sekvence byly rozděleny do typových jednotek (TJ) především podle sekvencí SL RNA. Samostatnou TJ tvořily izoláty (sekvence), jejichž vzájemná míra sekvenční podobnosti pro gen SL RNA nepoklesla pod 90 % (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007). Po zpětné kontrole s fylogenetickým stromem vytvořeným na základě SSU se objevily některé další typové jednotky [**TJ18** (P01, P05, P08), **TJ22** (P13, P16, P19), **TJ23** (P22), **TJ24** (P47) a **TJ60** (P17, P21)]. Celkem vzniklo 49 typových jednotek z ploštic, z nichž zcela nových a dosud nepopsaných se pouze v České republice vyskytovalo 17, 13 pouze v Ghaně a dvě pouze v Itálii. Dalších jedenáct typových jednotek bylo vytvořeno po zahrnutí i ostatních sekvencí pocházejících z nematocerního (komáři, tiplíci, psychody) nebo brachycerního hmyzu a také byly zahrnuty izoláty z blech. K šesti již vytvořeným typovým jednotkám z ploštic se také tyto sekvence přiřadily. Vytvořilo se tedy několik smíšených jednotek – jsou tvořeny jak izoláty z ploštic tak i z dipter či blech. Kombinace hostitelských skupin dvoukřídlí/ploštice byla nalezena u tří typových jednotek: **TJ04**, **TJ15** a **TJ16** (= *C. fasciculata*). Izoláty z ploštic a blech se současně vyskytují také ve třech typových jednotkách: (P01, P05, P08/B481), **TJ22** (P13, P16, P19/B873) a **TJ47** (P08/B466). Izoláty z dvoukřídlých a blech se společně objevily ve čtyřech typových jednotkách: **TJ51** (K06 A/B604 2, B1134), **TJ52** (J13, Ps46/JEZ1), **TJ53** (Ps29 A/B66) a **TJ58** (CUL13, K73/B481). Izoláty pouze z dipter vytvořily pět typových jednotek: **TJ54**, **TJ55** shodující se s druhem *H. trimorpha*, **TJ56**, **TJ57** (zastoupená mnoha izoláty shodnými s druhem *W. brevicola*) a **TJ59** (AustT3). Posledně jmenovaná typová jednotka představuje podivného zástupce trypanosomatid vyizolovaného z australského tiplíka, který se na fylogenetickém stromě nachází mezi trypanosomami a ostatními trypanosomatidy (Galková, 2010).

U ploštičích izolátů, které byly získány z několika různých území, můžeme vysledovat jistou míru endemismu v jejich geografickém rozšíření, což ale také může být způsobeno malým odběrem vzorků z jiných lokalit. Po zahrnutí i ostatních typových jednotek vytvořených izoláty z jiných skupin hmyzu bylo nalezeno pro Evropu 31 specifických typových jednotek, z toho bylo pouze v České republice popsáno 24 typových jednotek. Z afrického kontinentu bylo získáno 13 „endemických“ jednotek, z amerického tři a z Austrálie jedna. Současný výskyt na dvou světadílech byl pozorován u šesti typových jednotek. O kosmopolitním rozšíření můžeme hovořit u čtyř typových jednotek získaných ze tří nebo čtyř kontinentů.



Většina získaných sekvencí přísluší k jednohostitelským trypanosomatidům. Výjimkou jsou české izoláty P40 a P56 (**TJ06**), které představují nový druh dvouhostitelského rodu *Phytomonas*. Výskyt zástupce tohoto rodu, představující potenciální patogeny rostlin, byl již na území České republiky popsán (Dollet, 1984 cit. dle Sánchez-Moreno a kol., 1998). Naše izoláty se podařilo získat ze dvou druhů ploštic *Palomena prasina* a *Pentatoma rufipes*, které náleží do čeledi Pentatomidae. Intenzita nákazy ve střevě těchto ploštic byla velice slabá, je tedy možné, že většina bičíkovců byla přítomna ve slinných žlázách, odkud se přenáší na hostitelské rostliny. Například Sbravate a kol. (1989) získali několik kultur fytonomád – deset jich bylo izolováno ze slinných žláz ploštice a 6 dalších bylo ze střeva, z nichž tři vykazovaly současnou nákazu i slinných žláz. Hostitelských rostlin našich izolátů může být hned několik. Ploštice *Palomena prasina* je polyfágní druh, který nalezneme na širokém spektru živných rostlin, zatímco druh *Pentatoma rufipes* je většinou k nalezení na břízovitých a bukovitých (Wachmann a kol., 2008). Další tři potenciálně nové druhy fytonomád byly izolovány v Ghaně – **TJ30** (G24), **TJ31** [G38 (ENVI 3), G61 (ENVI 2), G66 (ENVI 3)] a **TJ32** [G30 (ENVI 2), G38 (ENVI 1), G63 (ENVI 2), G64 (ENVI 1), G65 (ENVI 1), G68]. Zajímavá a ne příliš jasná je pozice **TJ05** (P69 ENVI 2) na fylogenetickém stromě zkonstruovaném dle sekvencí SL RNA, která pochází z české ploštice *Oxycarenus lavaterae* a odvětňuje na bázi větve fytonomád. Tato fytofágní ploštice žije na několika druzích rostlin z čeledí Malvaceae a Tiliaceae, v našich podmínkách se jedná o nový, částečně invazní druh, které nalezneme na lípách, kde vytváří ohromné masy (Wachmann a kol., 2007).

Tři typové jednotky jsou shodné s již dříve popsány druhy. Jedná se o **TJ16** (P17, P21, P21 ENVI, P23 ENVI, P26 ENVI) izolovanou na území Čech z dravých druhů ploštic, a která se shoduje s druhem *Crithidia fasciculata*. Tento druh trypanosomatida se běžně vyskytuje u dvoukřídlých, a u hemipter byl zaznamenán jen výjimečně (Podlipaev, 1990). Je tedy pravděpodobné, že přítomnost tohoto druhu v dravých plošticích pochází z jejich kořisti, tak jak to bylo popsáno u druhu ploštice *Zelus leucogrammus* (Carvalho a Deane, 1974). Další jednotka **TJ21** (H10, H11, H18, H21, P59 až P64, SK03, G07, G58, G59, F19, F165, KYPR10) je tvořena izoláty z různých částí světa získaných z ploštic čeledi Pyrrhocoridae a patřících do druhu *Leptomonas pyrrhocoris*. Typová jednotka s označením **TJ40** (G32, G37) je tvořena dvěma ghanskými izoláty náležícími do druhu *Crithidia luciliae thermophila*, který byl popsán z ploštice *Zelus leucogrammus* (Podlipaev, 1990).

U pouhých šesti typových jednotek, nenáležících k žádné z již popsáných druhů trypanosomatid, se prokázala shodnost s již dříve objevenými jednotkami z Kostariky,

Ekvádoru či Číny (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010). Jde o případy **TJ01** (P02 ENVI, P04 ENVI, P41 ENVI, P48 ENVI, P49 ENVI, P57, P57 ENVI, P58 ENVI, P63 ENVI, P69 ENVI, P70 ENVI, G16, G36, G47, G48, G50, G52, G54, G55, G57) izolované z několika čeledí ploštic (Oxycarenidae, Pentatomidae, Pyrrhocoridae, Scutelleridae)<sup>4</sup> a shodující se s typovými jednotkami Ch1 (Čína) rovněž popsané z několika čeledí (Alydidae, Geocoridae, Pentatomidae) a TU44 (J. Amerika) z čeledi Coreidae. Jednotka **TJ10** (G01, G15, G20, G61 (ENVI 1), P29 ENVI 2, Si07 B) získaná z evropských ploštic z čeledí Gerridae a Miridae odpovídá typovým jednotkám Ch14 a TJ6/7 popsaných z čeledi Alydidae. S již popsanou jednotkou TU17 (Miridae) se shoduje nově vytvořená **TJ04** (P06 ENVI, P07 ENVI, P11 ENVI, P20 ENVI, P27 ENVI, P29 ENVI 1, P30 ENVI, P39 ENVI, PHA1 T, K97, G19), která byla získána z širokého spektra hostitelů – ploštic z čeledi Miridae, komára a tiplíka. U všech těchto tří typových jednotek (**TJ01**, **TJ04** a **TJ10**) můžeme předpokládat kosmopolitní rozšíření a alespoň v případě **TJ04** i velmi nízkou hostitelskou specifitu přesahující do několika řádů hmyzu. S čínskou jednotkou Ch8 izolovanou z ploštice náležící do čeledi Rhyparochromidae se shoduje jeden ghanský izolát G10 (**TJ38**), s další čínskou jednotkou Ch2 získanou z ploštic náležících do čeledí Gerridae a Reduviidae, je shodný slovenský izolát SK02 (**TJ43**) získaný z ploštice *Pyrrhocoris apterus*. Z Itálie byly získány dva izoláty Si04 a Si07-A (**TJ46**), které odpovídají čínské jednotce Ch15. I tyto další tři typové jednotky naznačují, že ačkoli je diverzita trypanosomatid obrovská, řada druhů je značně kosmopolitních a může se vyskytovat v různých čeledích ploštic.

Na fylogenetickém stromě zkonstruovaném na základě sekvencí genu SL RNA je patrné vytvoření statisticky dobře podpořené větve zahrnující pouze druhy patřící do rodu *Blastocrithidia* (Votýpka a kol., 2010). Tato větev blastocrithidií je též patrná na SSU stromě a mezi tyto organismy se přiřadily i některé naše izoláty. Nacházejí se zde typové jednotky, které se překrývají s již dříve zjištěnými typovými jednotkami jako **TJ01** (Ch1, TU44) a **TJ43** (Ch2). Vytvořily se však i samostatné větve, které mohou reprezentovat nové druhy – jednotka **TJ02** (H21) izolovaná z ploštice *Pyrrhocoris apterus*, **TJ03** (P33 ENVI, P34 ENVI) získaná z ploštic druhu *Scolopostethus thomsoni* a poslední jednotkou je **TJ45** (Si03, Si12) z italské ploštice *Lygaeus creticus*, která by mohla být příbuzným druhem k nově popsané blastocrithidii *B. largi* (Maslov a kol., 2010).

Nedá se říci, že by u rodu *Blastocrithidia* byla pozorována jakákoliv vazba na určitou čeleď ploštic. Byl totiž nalezen v několika různých čeledích. Jenom na českém území byl tento rod izolován z šesti ploštičích čeledí (Miridae, Oxycarenidae, Pentatomidae,

---

<sup>4</sup> U ghanských izolátů dosud nebyly determinovány hostitelské ploštice.

Pyrrhocoridae, Rhyparochromidae a Scutelleridae) a dokonce byly získány i izoláty z komára a tiplíka. Jistou vazbu na hostitele můžeme pozorovat u rodu *Herpetomonas*. Izoláty sekvenčně charakterizované z Čech byly nalezeny ve dvou dravých čeledích ploštic (Nabidae a Reduviidae). Avšak je nutné podotknout, že shodné izoláty byly nalezeny i v blechách, a také že herpetomonády se nejčastěji nachází v dvoukřídlych. Je tedy pravděpodobné, že jde o druhy, které jsou schopné přežít i v nevhodném hostiteli a do dravých ploštic se dostávají pravděpodobně s jejich kořistí.

Do blízkosti již popsaných druhů trypanosomatid rodu *Leptomonas* náleží i několik dalších typových jednotek. Sesterskou linií pro druh *L. neopamerae* je **TJ20** (P42 ENVI) z ploštice *Nepa cinerea*. Na „leptomonádové“ větvi L2 v rámci skupiny „SE“ tvořené např. druhy *L. pyrrhocoris*, *L. neopamerae* a *L. podlipaevi* se také ocitlo několik typových jednotek: **TJ36** (G40), **TJ37** (G07 ENVI) a **TJ42** (F221, TU-LS, KYPR01), z nichž dvě (TJ37 a TJ42) byly zjištěny u ruměnic současně parazitovaných *L. pyrrhocoris*. Sesterskou linií k druhu *L. barvae* tvoří jednotka **TJ44** zastoupená izolátem 124AL, který byl získán z jihoamerické ploštice (rod *Dysdercus*) taktéž patřící do čeledi Pyrrhocoridae.

Velice zajímavá je pozice environmentálních sekvencí jak pro SSU, tak i SL u izolátu P47 (**TJ17**), který tvoří sesterskou linii k druhu *L. costaricensis*. Tento druh leptomonády se považuje za možného předchůdce dvouhostitelského rodu *Leishmania* (Yurchenko a kol., 2006b). Jeho nalezení v neotropické oblasti vedlo ke spekulacím uvažujících o vzniku tohoto dvouhostitelského rodu právě v oblasti Ameriky. Proti této teorii však stojí objevení izolátu P47 z české ploštice a izolátu PAK5 z pákistánského pakomára (Galková, 2010) ve Starém Světě.

Jak již bylo zmíněno, řada izolátů získaných z různých ploštic čeledi Pyrrhocoridae patří k druhu *L. pyrrhocoris* (**TJ21**). V sekvenci pro gen SSU rRNA se izoláty téměř nelišily (1 – 2 nt), u genu pro gGAPDH, který vykazuje jemnější dělení, byly nalezeny 3 – 4 změny v nukleotidové sekvenci. Podstatnější odlišnosti byly zjištěny až u genu pro SL RNA (viz obr. 4.12), avšak nebyly větší než 10 %, což je stanovená hranice určující příslušnost ke stejnému druhu (Westenberger a kol., 2004). Na fylogenetických stromech je patrné vytvoření samostatné monofyletické skupiny izolátů náležících do **TJ21** v rámci skupiny „slowly evolving“, která má silnou statistickou podporu. Při analýzách celkového genomu jednotlivých izolátů metodou RAPD bylo prokázáno, že evropské izoláty jsou až na minimální odchylky (kyperského a francouzského izolátu) shodné, zato mezi jihoamerickými izoláty panuje značná variabilita. Toto zjištění bylo potvrzeno i fylogenetickou analýzou celé sekvence SL RNA včetně hypervariabilní intergenomické oblasti, která slouží k odlišení

rozdílů v rámci populací daného druhu trypanosomatida. Vysvětlení vyšší variability jihoamerických izolátů může být to, že druh *L. pyrrhocoris* má v této oblasti svůj původ. Navíc počet vhodných hostitelů, různých druhů rodu *Dysdercus*, je v oblasti Jižní Ameriky mnohem vyšší než počet evropských druhů rodu *Pyrrhocoris* a *Scantius*. Celkem je popsáno na 300 druhů ploštic čeledi Pyrrhocoridae vyskytujících se především v tropech a subtropích Starého Světa. Ve střední Evropě jsou popsány pouze dva druhy rodu *Pyrrhocoris* (*P. apterus*, *P. marginatus*) (Wachmann a kol., 2007). Dalším vysvětlením může být nedostatečný sběr vzorků na ostatních územích, čímž může být variabilita mezi izoláty značně zkreslena.

V rámci skupiny „SE“ na fylogenetickém stromě dle SSU rRNA je též patrné vytvoření větve crithidií („C“), ve které se objevilo několik nových typových jednotek. Jednak jsou to již výše zmiňované izoláty odpovídající druhu *C. fasciculata* (**TJ16**) a dále jsou to izoláty P17 a P21 tvořící typovou jednotku **TJ60** (dodatečně vytvořenou dle sekvencí SSU rRNA). Tato topologie je patrná i na stromě dle gGAPDH (obr. 4.6). Zajímavé je, že v případě těchto dvou izolátů získaných z dravých druhů ploštic šlo zřejmě o směsnou infekci, protože na fylogenetickém stromě dle sekvencí SL RNA jsou tyto izoláty shodné s druhem *C. fasciculata*. V blízkosti crithidií je patrná i další samostatná linie tvořená několika izoláty zahrnutých do jednotky **TJ15** (P10, P14, P29, P55), u které můžeme vysledovat příbuznost s linií tvořenou druhy *L. acus* a *L. tarcoles* a dvěma námi osekvenovanými izoláty Dipt08 (**TJ50**) z kostarické mouchy a G15 (**TJ10**) z ghanské plošnice. Tyto dva druhy leptomonád (*L. acus* a *L. tarcoles*) s typickými promastigoty byly popsány na základě morfologie, dokazujíc tak, že současná taxonomie založená na morfologických znacích je neodpovídá skutečným vztahům mezi jednotlivými druhy (Yurchenko a kol., 2008). Izolát P47 (**TJ24**) tvoří dle fylogenetického stromu gGAPDH sesterskou linii k druhu *C. abscondita*, který již není zahrnut v linii crithidií. Avšak dle sekvence SSU rRNA je náš izolát P47 v blízkosti popsaných druhů *C. insperata*, *C. deanei* a *L. bifurcata*. Tato nesrovnalost by mohla být způsobena záměnou našich vzorků nebo směsnou infekcí.

Jednohostitelská trypanosomatida izolovaná z blech tvoří na fylogenetických stromech samostatnou monofyletickou linii se silnou statistickou podporou (Suková, 2009). Některé izoláty z blech se ojediněle vyskytly mimo tuto větev a objevily se mimo jiné na větvi tvořené druhy rodu *Herpetomonas*. S těmito herpetomonádami jsou shodné taktéž izoláty z dravých druhů ploštic **TJ18** [(P01, P05, P08)/B481 (blecha)] a **TJ22** [(P13, P16, P19)/B873 (blecha)] (komentář dále v kap. 5.6).

Z kultury označené P19 jsme získali dva typy sekvencí, jejichž pozice se v rámci fylogenetických stromů liší. Tato kultura tak s největší pravděpodobností zahrnuje dva rozdílné organismy. První organismus se dle sekvence SSU nachází mezi herpetomonádami, druhý dle sekvencí SL RNA patří mezi crithidie. Podobně rozporuplné výsledky jsme získali z kultury izolátu P08, který taktéž náleží na základě SSU mezi herpetomonády, zatímco SL sekvence jej řadí do blízkosti wallacein. Obě tyto směsné kultury byly získány ze dvou druhů lovčic (Nabidae). Druh *Wallaceina brevicula* byl taktéž získán a popsán z dravé plošnice *Nabis brevis* (Podlipaev, 1990). K této wallaceině jsou na základě sekvencí velmi příbuzné i druhy *L. peterhoffi* a *B. gerricola*. Oba tyto druhy byly popsány přímo ze střeva plošnice, avšak sekvence byly získány až z kultury. Pravděpodobně se v těchto případech jednalo o směsnou infekci, kdy v plošnici byly přítomny dva druhy parazitů. Jeden převažoval v plošnici, podle nějž byl proveden morfologický popis, avšak v kultuře se objevil druhý druh – wallaceina, která byla osekvenována (Merzlyak a kol., 2001). V našem případě se podařilo kultivovat i osekvenovat oba druhy trypanosomatid současně, proto vznikly nesrovnalosti v umístění izolátů na dvou různých fylogenetických stromech. Otázkou zůstává, který z obou druhů v kultuře po čase převáží (kultury jsou v současnosti zamražené).

Směsná infekce musí být vysvětlením i pro různé pozice sekvencí z environmentálního vzorku P30. Podle sekvencí SL spadá tento izolát do typové jednotky **TJ04**/TU17, avšak podle sekvencí SSU je naprosto shodný s izolátem P36 (**TJ11**). Podle elektroforetogramu SL byl přítomen pouze jeden proužek a směsná infekce tak nebyla detekována. Je pravděpodobné, že jeden organismus se hůře amplifikuje pomocí jednoho typu primerů nebo může být v „envi“ vzorku dominantní a druhý tak nemusí být tímto způsobem odhalen.

V blízkosti dalších druhů herpetomonád se objevily typové jednotky **TJ07** (P53 ENVI) – u *H. roitmani* a **TJ23** (P22) v blízkosti *H. samuelpeossoi*. Mezi herpetomonády je řazen i druh *L. lactosovorans*, v jehož blízkosti se ocitly další dvě typové jednotky **TJ25** (P23, Si15) a **TJ14** (P18). Zajímavá je též pozice **TJ08** (P52 ENVI), která tvoří na fylogenetickém stromě dle SL RNA sesterskou linii k druhu *Sergeia podlipaevi*. Tento izolát by tak mohl představovat dalšího zástupce nově ustaveného rodu *Sergeia* (Svobodová a kol., 2007).

Několik typových jednotek se objevilo v blízkosti již popsaných typových jednotek z Kostariky a Ekvádoru (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007) a z Číny (Votýpka a kol., 2010). Sesterské skupiny vytvořily **TJ11** [(P30 ENVI, P36 ENVI, G33, F17, F46, F98, F115, F167, F248)/TU43], **TJ12** [(P71 ENVI)/TU8], **TJ13** [(P29 ENVI 3)/TU35], **TJ26** (G13) a **TJ27** (G35)/Ch8, **TJ28** [(G09, G25, G45)/TU12], **TJ29** [(G21)/Ch15], **TJ33** [(G29, G31, G44)/TU6/7/Ch14], **TJ41** [(Si10, Si17)/TU12]. Tyto asociace mezi blízkými příbuznými druhy by mohly být případy allopatrické speciace.

## 5.5 Geografické rozšíření v závislosti na hostitelské specifitě

Na základě výsledků získaných v průběhu této práce můžeme spíše usuzovat na relativně nízkou hostitelskou specifitu. Dále se tak bortí paradigma „jeden hostitel – jeden druh“, které sloužilo jako teoretický základ pro popisy mnoha nových druhů v minulém století. Naše výsledky potvrdily opakovaný výskyt jednoho druhu parazita v různých druzích ploštic a současně jsme zjistili, že jeden hostitel může hostit více druhů trypanosomatid. Příkladem směsné infekce může být izolát P29 z ploštic *Stenotus binotatus*. Sekvence získané z tohoto izolátu se přiřadily ke čtyřem typovým jednotkám. V kultuře vyrostl jeden druh trypanosomatida (**TJ15**), zatímco v „envi“ vzorku byly odhaleny další tři typové jednotky (**TJ04**, **TJ10**, **TJ13**). Tato zjištění o existenci směsných infekcí se plně shodují s výsledky zjištěnými při průzkumech diverzity trypanosomatid v Jižní Americe a Číně (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010).

O rozšíření mikroorganismů existují v zásadě dvě představy. Jedna tvrdí, že jsou ubikvitní a vyskytují se všude (Finlay, 2002) a druhá se přiklání k existenci mírného endemismu (Foissner, 2006). Izoláty společně označené jako **TJ01** odpovídají již dříve popsané jednotce Ch1 izolované z čínských ploštic s izoláty náležícími do několika čeledí (Alydidae, Geocoridae a Pentatomidae) (Votýpka a kol., 2010) a zároveň je shodná s typovou jednotkou TU44 popsané z novosvětského zástupce čeledi Coreidae (Maslov a kol., 2007). V České republice byla typová jednotka **TJ01** také nalezena v čeledi Pentatomidae (jako v Číně), ale navíc též v čeledích Oxycarenidae, Pyrrhocoridae a Scutelleridae. U této typové jednotky by mohlo být dosaženo celosvětového rozšíření právě skrze parazitaci v širokém spektru hostitelů a její kosmopolitní rozšíření dává za pravdu spíše ubikvitnímu modelu.

Typová jednotka TU17 byla popsána z novosvětských ploštic rodu *Dolichomiris* (Miridae) (Maslov a kol., 2007). Na českém území byla shodná typová jednotka (**TJ04**) objevena v dalších zástupcích čeledi Miridae, což by naznačovalo vyšší hostitelskou specifitu s kosmopolitní vazbou na jednu čeleď. Ovšem přítomnost této typové jednotky byla zjištěna i u dvoukřídlých, a to konkrétně v tiplíkovi a komárovi, tudíž hostitelská specifita bude mnohem nižší.

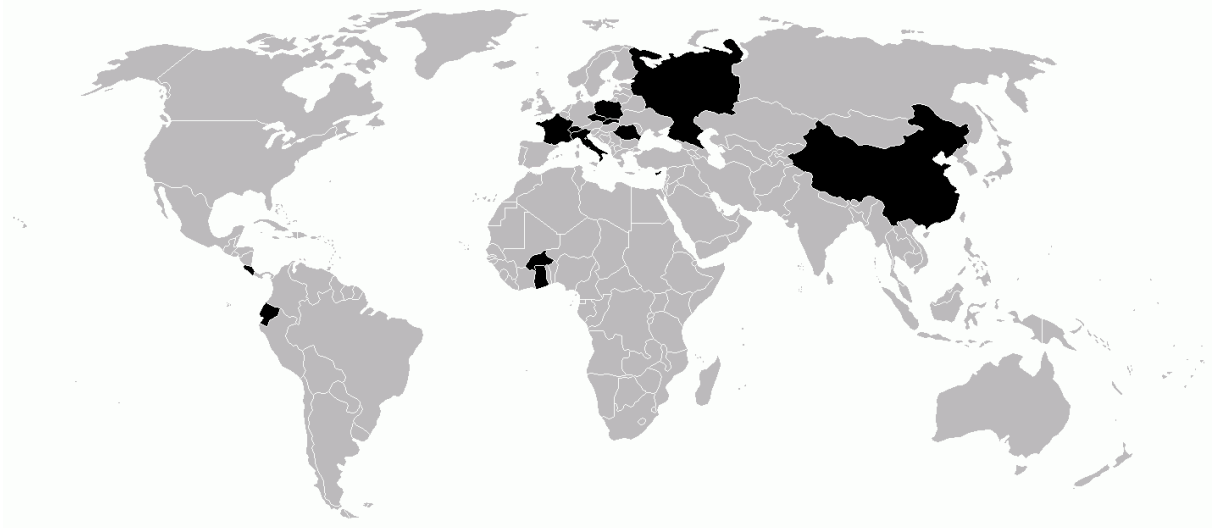
Nízkou hostitelskou specifitu můžeme pozorovat i u typových jednotek **TJ18** (P01, P05, P08/B481), **TJ22** (P13, P16, P19/B873) a **TJ47** (P08/B466), ve kterých nalezneme shodné izoláty, které pocházejí z ploštic a z blech. Typová jednotka **TJ47** tvoří sesterskou linii k druhu *Wallaceina brevicula*. Přenos mezi plošticí a blechou by mohl probíhat několika způsoby. Mohlo by dojít k predaci blechy (larvárního stádia či dospělé) plošticí nebo by

mohl být spojovacím článkem mezi těmito různými skupinami hmyzu jiný hostitel, např. zástupce dvoukřídlého hmyzu (viz kap. 5.6)

U izolátu z blechy (B466) byla provedena morfologická analýza a na roztěrech barvených Giemsou byly pozorovány pro wallaceiny typické endomastigotní formy (Suková, 2009). Rod *Wallaceina* je na fylogenetickém stromě SL zastoupen několika izoláty z různých skupin hmyzu: CUL26, CUL34 a CUL40 z komárů, K36, K37, K42 a K53 z tiplíků a Ps46 z psychody, které jsou s původní sekvencí *W. brevicula* téměř shodné (Suková, 2009; Galková, 2010). Dále se k této typové jednotce (**TJ57**) řadí *Wallaceina incostans*, *Leptomonas peterhoffi*, *Blastrocrithidia gerricola*, *Leptomonas* sp. F2, F5 a F6, což jsou všechno druhy popsáné z různých druhů ploštic na území severního Ruska (Merzlyak a kol., 2001; Kostygov a kol., 2004). Nesrovnalosti vzniklé přiřazením některých izolátů do různých rodů, vznikly zřejmě proto, že jejich morfologie byla popsána přímo z ploštice a sekvence byly následně pořízeny z kultury (Merzlyak a kol., 2001). V ploštici musela být přítomna směsná infekce a wallaceina záhy přerostla původního trypanosomatida. Tento rozpor mezi morfologií a fylogenetickou pozicí by mohl být také vysvětlen kontaminací při manipulaci s kulturami, jelikož všechny tyto izoláty byly popsány v jedné laboratoři. Je evidentní, že tento druh, odpovídající typové jednotce **TJ57**, disponuje dosud nejširší známou hostitelskou specifitou (heteroptera, diptera), na druhou stranu však tento komplex byl dosud izolován pouze z hmyzu ve Starém Světě, takže je možné, že bude vykazovat jisté geografické omezení ve svém rozšíření.

U druhu *Leptomonas pyrrhocolis* (**TJ21/Ch11/TU1**) se potvrdila jeho vazba na druhy ploštic čeledi Pyrrhocoridae a dosud nebyl nalezen v plošticích jiné čeledi. *L. pyrrhocolis* je druh, který byl původně popsán z ploštice *Pyrrhocoris apterus* v Evropě (konkrétně Francie, Itálie, Švýcarsko, Polsko a Rumunsko) (Wallace, 1966), dále byl jeho výskyt zjištěn v Jižní Americe (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007) a Číně (Votýpka a kol., 2010). V průběhu této práce jsme vyvinuli značné úsilí, abychom získali co nejširší škálu izolátů. Snažili jsme se odchytnout všechny druhy ploštic čeledi Pyrrhocoridae žijící nejen v České republice (problematický byl zejména odchyt druhu *P. marginatus*), ale také v celé Evropě, a to z různých oblastí. Při analýzách našich izolátů z ploštic čeledi Pyrrhocoridae, jsme odhalili, že mnohé z nich přísluší k druhu *L. pyrrhocolis*, ale navíc jsme zjistili, že ploštice mohou hostit i další druhy jednohostitelských trypanosomatid.

V této práci byla ověřena příslušnost izolátů pocházejících z různých států (a světadílů) k druhu *L. pyrrhocolis*, a bylo tak prokázáno, že s jednáu o kosmopolitně rozšířený druh (obr. 5.1) s vazbou na čeleď Pyrrhocoridae. Navíc různé druhy ploštic z této čeledi mohou hostit i druhy jednohostitelských trypanosomatid náležící do jiných typových jednotek (celkem 10).



Obr. 5.1 Rozšíření druhu *Leptomonas pyrrhocolis* potvrzený na základě nálezů z ploštic

Jednak jsou to čtyři izoláty spadající na SL stromě do větve blastocrithidií: **TJ01** [(P63 ENVI)/Ch1/TU44], **TJ02** [(H21 ENVI)], **TJ43** [(SK02)/Ch2], **TU34** [(80MV ENVI)] a **Ch4** [(CH392)]. Další čtyři typové jednotky jsou blíže příbuzné k již popsaným druhům leptomonád (např. *L. podlipaevi*, *L. pyrrhocolis*) umístěným v rámci skupiny „SE“: **TJ37** [(G07 ENVI)] , **TJ42** [(F221, KYPR01, TU-LS)], **TJ44** [(124AL)] a **Ch10** [(CH391)]. Poslední typová jednotka **TJ11** (F115) z čeledi Pyrrhocoridae je v blízkosti TU43, u které je nejasná rodová příslušnost.

Typová jednotka **TJ44** (124AL), pocházející rovněž z ploštic čeledi Pyrrhocoridae (*Dysdercus obscuratus*), byla dříve označena jako TU1 (Maslov a kol., 2007), ovšem po provedení RAPD analýzy (data nezobrazena) jsem zjistila, že tento izolát vykazuje odlišný genetický profil než izoláty patřící do druhu *Leptomonas pyrrhocolis*. Po dodatečném osekvenování SL RNA jsme zjistili, že na fylogenetickém stromě se nachází v rámci větve „SE“ poblíž monofyletické skupiny *L. pyrrhocolis*, avšak není s ní identický a vytváří samostatnou jednotku **TJ44**.

Také typová jednotka **TJ42** byla izolována pouze z ploštic čeledi Pyrrhocoridae, avšak na rozdíl od *L. pyrrhocolis* je tento potenciálně nový druh („*L. scanti*“) omezen pouze na oblasti Starého Světa. Dosud byl nalezen v ploštících druhu *Scantius aegyptius* a *Pyrrhocoris apterus* z oblasti v jižní Francii, na Kypru a v Tunisku.

Kosmopolitní rozšíření v rámci parazitace jedné hostitelské čeledi bylo diskutováno i pro typové jednotky TU6/7 z Jižní Ameriky a Ch14 z Asie, které byly izolovány z ploštic patřících do čeledi Alydidae (Westenberger a kol., 2004; Maslov a kol., 2007; Votýpka a kol., 2010). Ovšem na českém území byla tato typová jednotka (**TJ10**) nalezena i v ploštic



*Stenotus binotatus* z čeledi Miridae. Nelze tedy o tomto druhu prohlásit, že se podobně jako druh *Leptomonas pyrrhocoris* specializuje pouze na jednu čeleď ploštic. Dále byl výskyt této jednotky (TJ10) doložen i na území Itálie v čeledi ploštic Gerridae a v dosud nedeterminovaných plošticích z Ghany. U typové jednotky TJ11 nalezneme izoláty získané především z Francie (z ploštic čeledí Pyrrhocoridae a Rhopalidae), ale také z České republiky (z ploštic čeledí Coreidae a Miridae) a Ghany (zatím neurčeno), tudíž se také bude jednat o kosmopolitní druh s širokou hostitelskou specifitou.

Analyzovaná data nedokládají žádnou výraznou geografickou vazbu jednotlivých druhů trypanosomatid. Potvrdit, zda se jedná o endemický druh omezený svým rozšířením na určité území nebo naopak o kosmopolitu, bude poměrně složité, vzhledem ke skutečnosti, že dosud nebyla biodiverzita trypanosomatid dostatečně prozkoumána ve všech oblastech. Řešení otázky hostitelské specifity nebude také zcela triviální. Lze pozorovat různou míru hostitelské specifity. Jednak byla pozorována úzká vazba druhu *Leptomonas pyrrhocoris* na ploštice patřící do jedné čeledi, zároveň však byla odhalena přítomnost některých typových jednotek v několika různých čeledích ploštic a dokonce i v různých řádech hmyzu.

## 5.6 Přenos jednohostitelských trypanosomatid

Přenos jednohostitelských trypanosomatid může probíhat několika cestami – kontaminací prostředí infekčními stádii nebo pseudocystami, koprofágií, kanibalismem nebo nákazou z infikované kořisti (Carvalho a Deane, 1974; Schaub a kol., 1989; Tieszen a Molyneux, 1989b).

Moje práce byla zaměřena na dlouhodobý průzkum biodiverzity jednohostitelských trypanosomatid na jedné lokalitě a měla mj. vyústit v osvětlení biologie a přenosových cyklů těchto bičíkovců. Bohužel byla celková prevalence trypanosomatid u ploštic velmi nízká a nepodařilo se získat dostatečné množství izolátů pro porovnávací ekologické analýzy. Přesto jsou některé souvislosti s přenosem a výskytem druhů i tak dobře patrné. V plošticích z čeledi Nabidae (lovčice) bylo nalezeno několik rozdílných typových jednotek (TJ14, TJ15, TJ16, TJ18, TJ19, TJ22 a TJ 23). Typová jednotka TJ15 je tvořena izoláty získanými nejen z lovčic druhů *Nabis brevis* a *N. rugosus*, ale také z klopušek (Miridae) *Closterotomus norwegicus*, *Megaloceroea relicticornis* a *Stenotus binotatus*. U těchto klopušek se jedná o fytofágní druhy a u všech tří druhů přezimuje pouze stádium vajíčka (Wachman a kol., 2004). Parazit by tedy měl nějakým způsobem přezimovat s vajíčkem, aby se přenesl do další generace klopušek. Parazit by ovšem také mohl přezimovat v nakažených lovčících, jelikož u těchto druhů přezimují dospělci (Wachmann a kol., 2006). Stejně tak jako u bruslařek (Tieszen

a Molyneux, 1989b) by na jaře nákazu šířili přezimující dospělci. Z lovčic by se nákaza na klopušky, ale i na ostatní jedince v populaci, mohla šířit kontaminací. Jelikož tyto ploštice (klopušky a lovčice) byly odchyceny na stejné lokalitě a navíc je pro tyto druhy typický výskyt ve stejných travnatých biotopech (Wachmann a kol., 2004, 2006), je to vcelku pravděpodobné. Lovčice se mohou nakazit z infikovaných klopušek predací. Tato typová jednotka (**TJ15**) byla také nalezena v dvoukřídlých (psychoda a komár), kteří mohou být jak zdrojem kontaminace prostředí, tak i potravou dravých ploštic.

Také některé další typové jednotky byly izolovány nejen z lovčic, ale i z jiných zástupců tří čeledí ploštic. Typová jednotka **TJ16**, která je shodná s již popsaným druhem *Crithidia fasciculata*, byla taktéž izolována nejen z dravých ploštic čeledi Nabidae (*N. brevis*, *N. pseudoferus*), ale i také z dalšího dravého druhu *Rhynocoris iracundus* (Reduviidae) a fytofágní klopušky *Capsus ater* (Miridae). Jelikož tento druh crithidie byl již popsán z různých druhů komárů (Podlipaev, 1990; Galková, 2010), můžeme předpokládat, že se ploštice pravděpodobně nakazily predací. Stejně tak jako tomu bylo v případě dravé ploštice *Zelus leucogrammus*, ve které byla nalezena trypanosomatida z potravy (Carvalho a Deane, 1974). Také fytofágní klopuška se mohla nakazit sáním na infikovaném komárovi, protože je známo, že i u typicky fytofágního druhu *Teratocoris saundersi* (Miridae) byla pozorována přídatná zoofágie (Wheeler a Skaftason, 2010). Tímto chováním by se mohl vysvětlit společný výskyt **TJ15** i **TJ16** v dvoukřídlých a plošticích. Není ovšem možné vyloučit ani kontaminaci prostředí.

Z druhu *Rhynocoris iracundus* byla v kultuře zjištěna i další typová jednotka trypanosomatida, **TJ25** (*C. fasciculata*/T16 byla u tohoto jedince osekvenována z environmentálního vzorku), u kterého se prokázala blízká příbuznost s druhem *Herpetomonas samuelpessoai*. Vzhledem k tomu, že herpetomonády nepatří mezi rody, které se často vyskytují u ploštic, ale spíše u dvoukřídlých, dá se přítomnost tohoto parazita v dravé ploštici *Rhynocoris iracundus* vysvětlit lovem. Obdobné výsledky pro kulturu (**TJ24**) a environmentální vzorek (**TJ17**) byly získány u dravé kněžice *Picromerus bidens*. Tato ploštice se často živí na housenkách motýlů a larvách mandelinkovitých (Wachmann a kol., 2008). Je tedy možné, že některý druh parazita mohla získat ze své kořisti. Další dravá ploštice, u které byla zjištěna přítomnost trypanosomatid, je *Arma custos* (Wachmann a kol., 2008). Potrava této ploštice je tvořena larvami nejen motýlů a brouků, ale i nymfami ploštic, které se mohou vyskytovat na stejném typu živných rostlin (bříza a olše) jako tento druh ploštice.

Zajímavá je otázka přenosu jednohostitelských trypanosomatid nalezených v ploštících a zároveň v blechách. Jedná se o následující typové jednotky **TJ18** (*Gerris gibbifer*, *Nabis pseudoferus*, *Nabis brevis* / *Monopsyllus sciurorum*), **TJ22** (*Nabis pseudoferus*, *Nabis brevis* / *Chaetopsylla globiceps*) a **TJ47** (*Nabis pseudoferus*/*Monopsyllus sciurorum*). Přenos těchto druhů parazitů by se mohl vysvětlit několika způsoby. Jedním by mohlo být ulovení blechy dravou plošticí. Je to sice málo pravděpodobné, ale určitě to nelze vyloučit. Blechu je možné nasmykat (pravděpodobnost jednou za 10 let) z trávy, kde čeká na nového hostitele (Kment, ústní sdělení). Druhou možností je přiživování se ploštice na zdechlíně hostitele blechy (Constant, 2007). Jak bylo popsáno u druhu *H. muscarum*, jsou bičíkovci schopni přežít jistou dobu na povrchu masa a mohou tak sloužit jako zdroj nákazy (Becker, 1923b). To by se mohlo uplatnit i v tomto případě přenosu z blechy na ploštici. Blechy *Monopsyllus sciurorum* byly odchyceny na plchovi velkém a *Chaetopsylla globiceps* na lišce obecné. Spojovacím článkem při přenosu z blechy na ploštici by mohl být i výskyt stejného druhu trypanosomatida v jiné skupině hmyzu. Cesta přenosu mezi blechami probíhá pomocí koprofágie a larvy se nakazí z trusu dospělce (Beard a kol., 1989). V hnízdech nebo norách savců probíhá vývoj nejen blech, ale i jiného hmyzu, který by se mohl kontaminativní cestou nakazit bleším druhem trypanosomatida. Infikovaní dospělci by pak mohli být zdrojem nákazy pro ploštice. Další možností je přítomnost samotné ploštice v hnízdech savců, kde by mohly sít na infikovaných larvách blech. Sice dosud nebyl nalezen trypanosomatid, který by se vyskytoval v ploštících, blechách a dvoukřídlém hmyzu zároveň, ale to může být způsobeno nedostatečným množstvím testovaných vzorků. Případy, kdy se stejná typová jednotka trypanosomatida vyskytovala současně v bleše a dvoukřídlém hmyzu, jsou již odhaleny. Jedná se o typové jednotky **TJ50** izolované z blech *Ctenocephalides canis* a *Pulex irritans* a současně z tiplíka *Culicoides obsoletus*, **TJ51** z blechy *Paraceras melis* a psychody *Psycha grisescens* a **TJ52** z blechy *Ctenophthalmus assimilis* a psychody rodu *Logima* (Suková, 2009; Galková, 2010). V bleše (*Monopsyllus sciurorum*), komárovi (*Culex pipiens*) a tiplíkovi (*Culicoides pulicaris*) byl nalezen zvláštní typ bičíkovce, který se na fylogenetickém stromě vyskytuje na pomezí trypanosomatid a bodonid, a který také vykazuje nízkou hostitelskou specifitu. Tento druh by mohl být předchůdcem všech trypanosomatid a vzhledem ke skutečnosti, že už byl nalezen v dvoukřídlých a blechách, je jen otázkou času, kdy bude objeven u ploštic nebo jiné skupině hmyzu.

Mezi plošticemi, které vytvářejí agregace, bude přenos trypanosomatid značně ulehčen, tak jak to bylo navrženo pro druh *Gerris remigis* (Tieszen a Molyneux, 1989b). Díky blízkému kontaktu jedinců se paraziti budou přenášet kontaminativní cestou, kdy se infekční

stádia dostanou na společný zdroj potravy. Další cestou nákazy je vzájemný kanibalismus, resp. nekrofágie na členech vlastní kolonie. Agregace vytváří například druhy *Pyrrhocoris apterus*, *Oxycarenus lavaterae* a *Kleidocerys resedae* (Wachmann a kol., 2007), u kterých byla námi také trypanosomatida nalezena. Navíc u těchto druhů ploštic jsme pozorovali směsné infekce, a to i v rámci jedné populace daného druhu ploštic. Zdá se, že mezi druhy ploštic tvořícími agregace se nákaza šíří rychleji.

Typová jednotka **TJ11** je tvořená izoláty ze dvou druhů ploštic – *Coreus marginatus* (Coreidae) a *Calocoris affinis* (Miridae). Oba druhy jsou značně polyfágní a mohou se vyskytovat na různých živných rostlinách (Wachmann a kol., 2004, 2007). Stejně tak jako u ploštic *Oncopeltus fasciatus* a leptomonády *L. oncopelti* (McGhee a Hanson, 1962), by i zde mohlo docházet k přenosu přes kontaminovanou potravu. Tento způsob přenosu by se mohl uplatnit i u dalších značně polyfágních druhů klopušek (*Adelphocoris quadripunctatus*, *Apolygus lucorum*, *Calocoris affinis*, *Closterotomus norwegicus*, *Liocoris tripustulatus*, *Lygus rugulipennis*), z nichž byly získány izoláty spadající do typové jednotky **TJ04**.

Obecně mezi plošticemi jednoho druhu i mezi různými druhy by se trypanosomatida mohla přenášet kontaminací potravy, tak jak to bylo popsáno u druhu *Oncopeltus fasciatus* (McGhee a Hanson, 1962). Pro některé stenofágní druhy ploštic je charakteristický výskyt pouze na jedné živné rostlině, naopak polyfágní druhy by mohly přenášet trypanosomatida nespecificky a kontaminovat potravní zdroje i jiných druhů ploštic. Tak by se dal vysvětlit přenos typové jednotky **TJ01**, kterou nalezneme např. u polyfágního druhu *Dolycoris baccarum* i u několika stenofágních druhů (*Eurygaster testudinaria*, *Eysarcoris aeneus*, *Eurydema dominulus*, *Pyrrhocoris marginatus* a *Oxycarenus lavaterae*), které jsou **již** vázané pouze na určité typy živných rostlin (Wachmann a kol., 2007, 2008)

U druhů, u nichž přezimuje jenom stádium vajíčka, by se trypanosomatida do další generace mohla přenést v tzv. „symbiotické kapsuli“ obsahující endosymbiotické bakterie (Hosokawa a kol., 2005). Ovšem tvorba této kapsule je charakteristická pouze pro čeleď Plataspidae. Mezi infikovanými druhy ploštic, odchycených v rámci této studie, se vyskytují i druhy, které přezimují jako vajíčko. U „bez kapsulových“ druhů ploštic by mohlo docházet k transovariálnímu přenosu endosymbiontů, avšak transovariální cesta přenosu nebyla dosud u jednohostitelských trypanosomatid potvrzena (Schaub a kol., 1989). Dalším způsobem by mohlo být přezimování parazitů v dvoukřídlém hmyzu nebo v jiném druhu ploštic, který přezimuje jako dospělec nebo nymfa. Navíc je možné, že při přenosu trypanosomatid ploštic se mohou uplatňovat i další skupiny hmyzu, které dosud nebyly na trypanosomatida zkoumány, a které jsou nějakým způsobem v interakci s plošticemi. Zjištěná nízká hostitelská specifita by tomu mohla nasvědčovat. Popsané modely přenosu jednohostitelských

trypanosomatid se budou v určité míře jistě uplatňovat u každého druhu bičíkovce, avšak určit, která cesta je převládající, bude vyžadovat další studie zaměřené na ekologii trypanosomatid a jejich hostitelů.

## 5.7 Morfologie druhu *Leptomonas pyrrhocoris*

U izolátů získaných z ploštic čeledi Pyrrhocoridae, u kterých byla na základě sekvenčních dat pro geny SSU rRNA, gGAPDH a SL RNA prokázána příslušnost do druhu *L. pyrrhocoris*, bylo provedeno morfologické měření jak buněk získaných z kultury, tak i buněk získaných přímo při pitvě ploštice. Z analýz byly vyloučeny izoláty, u nichž byla v environmentálních vzorcích zjištěna přítomnost jiného druhu trypanosomatida. V ploštici i v kultuře bylo pozorováno několik rozdílných morfologických typů buněk a toto pozorování je ve shodě s již dříve publikovanými daty (Frolov, 1987). Při popisu nového druhu se provádí často měření morfologických znaků, které by měly být charakteristické pro daný druh. Naše zjištění však tento předpoklad o druhově charakteristické morfologii nepotvrdilo, mj. na základě skutečnosti, že jednotlivé izoláty mezi sebou vykazují vysokou míru polymorfie a nelze je rozřadit ani do jednotlivých, vzájemně shodných skupin. V kulturách bylo přítomno několik typů buněk i v rámci jedné pasáže. V kulturách izolátů SERG a F19 byly převládajícím typem malé kulaté promastigoti, zatímco v ostatních kulturách byly nejhojněji přítomny dva typy buněk (střední promastigoti a štíhlé leptomonádové formy). U izolátů H10 byli výjimečně přítomni i choanomastigoti. Existuje pochopitelně možnost, že tyto značně morfologicky rozdílné formy byly výsledkem rozdílné kultivace daných izolátů, avšak naše snaha byla, aby všechny kmeny měly stejné kultivační podmínky. Jak jsem již uvedla, značná morfologická variabilita, a to jak *in vivo* tak i *in vitro*, byla již pro druh *L. pyrrhocoris* prokázána jinými autory (Frolov, 1987), avšak výrazná polymorfie byla pozorována i u dalších druhů a rodů trypanosomatid, např. *H. trimorpha* (Zídková a kol., 2010).

Velice diskutabilní je i výsledek měření šířky kinetoplastu u tří kultivovaných izolátů druhu *L. pyrrhocoris*. Šířka kinetoplastu byla popsána jako druhově specifický determinační znak kinetoplastid, který by měl být v rámci daného izolátu stabilní (Votýpka a kol., 2002). Rozdíly mezi šířkou kinetoplastů byly s úspěchem použity při odlišení jednotlivých druhů izolovaných z tiplíků (Svobodová a kol., 2007; Zídková a kol., 2010). Avšak srovnáním šířky kinetoplastu u třech různých izolátů (H10 z ČR, F19 z Francie a 122AL z Ekvádoru) náležících ke stejnému druhu (*L. pyrrhocoris*) se zjistilo, že tento znak zdaleka není stabilní. Naměřené hodnoty u jednotlivých izolátů se signifikantně liší a vytváří tři oddělené skupiny. Tento znak tedy nebude u tohoto druhu trypanosomatida druhově specifický, jelikož jak bylo prokázáno sekvenačně, jedná se o stejný druh, ale jednotlivé izoláty (tj. populace) se přesto liší šířkou kinetoplastu.

## 6 ZÁVĚR

V průběhu této studie zaměřené na trypanosomatida ploštic bylo vypitváno přes 1200 jedinců náležících do 110 druhů, 78 rodů a 27 čeledí. Celková prevalence nákazy trypanosomatidy činila 6 % a mezi nejčastěji parazitované čeledi ploštic na českém území patří Nepidae, Pyrrhocoridae, Oxycarenidae, Lygaeidae, Pentatomidae a Nabidae. Paraziti byli lokalizováni v zaživací soustavě ploštic (mesenteron a proctodeum) a přidružených orgánech (Malphigické trubice), kde se vyskytovali jako formy volně pohyblivé nebo přisedlé ke střevní stěně.

U všech zjištěných infekcí byla snaha převést trypanosomatida do kultury, což se podařilo v 37 % všech případů. Vykultivované izoláty z českých ploštic se na fylogenetickém stromě ocitly v blízkosti leptomonád, crithidií, blastocrithidií, herpetomonád a wallacein. Abychom nebyli omezeni pouze na kultivovatelné vzorky, byla celková diverzita izolátů získaných jak z ČR tak i dalších oblastí (jižní Evropa, Ghana aj.) studována pomocí molekulárně-biologického přístupu nezávislého na kultivaci. Tímto způsobem bylo odhaleno celkem 49 typových jednotek (ve smyslu potenciálně nových druhů), z nichž 17 bylo unikátních pro české druhy ploštic.

Naše data neprokázala žádnou výraznou geografickou vazbu jednotlivých druhů trypanosomatid. Některé typové jednotky se jeví jako endemické (což ovšem může být způsobeno nedostatečným počtem vzorků) jiné vykazují kosmopolitní rozšíření. Pozorovaná hostitelská specifita byla obecně spíše nízká. Izoláty náležící ke stejné typové jednotce byly objeveny v různých čeledi ploštic a často se navíc vyskytovaly i v dalších skupinách hmyzu – v blechách nebo v dvoukřídlých.

Překvapivá byla nízká prevalence nákazy ploštic na českém území – obdobné studie z tropických a subtropických oblastí udávají mnohem vyšší hodnoty. V důsledku nízké prevalence českých ploštic se nám nepodařilo získat dostatečné množství izolátů pro porovnávací ekologické analýzy. Nicméně některé závislosti a možnosti přenosu byly vysledovány.

Druh *Leptomonas pyrrhocris* je kosmopolitně rozšířený a hostitelsky specifický pro ploštice čeledi Pyrrhocoridae, u kterých však byla zjištěna i přítomnost (v některých jedincích současně s druhem *L. pyrrhocris*) řady dalších trypanosomatid. Největší genetická diverzita mezi jednotlivými izoláty druhu *L. pyrrhocris* byla pozorována v neotropické oblasti, což by mohlo svědčit pro novosvětský původu tohoto druhu. Na rozdíl od *L. pyrrhocris* vykazuje typová jednotka TJ42 (TU-LS), vyskytující se také u ploštic čeledi Pyrrhocoridae, geografické omezení na Starý Svět. Také morfologická analýza jednotlivých izolátů náležících k druhu *L. pyrrhocris* potvrdila značný polymorfismus a druhově specifický znak – výška kinetoplastu – se u *L. pyrrhocris* ukázal jako nevhodný determinační znak.

## 7 PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY

- Abe, Y. (1980). On the encystment of *Leptomonas* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a parasite of the silkworm, *Bombyx mori* Linnaeus. *Journal of Protozoology*, 27: 372–374
- Abreu Filho, B. A., Dias Filho, B. P., Vermelho, A. B., Jankevicius, S. I., Jankevicius, J. V. & dos Santos, R. L. (2001). Surface component characterization as taxonomic tools for *Phytomonas* spp. identification. *Parasitology Research*, 87: 138–144
- Agabian, N. (1990). Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*, 61: 1157–1160
- Arnqvist, G. & Mäki, M. (1990). Infection rates and pathogenicity of trypanosomatid gut parasites in the water strider *Gerris odontogaster* (Zett.) (Heteroptera: Gerridae). *Oecologia*, 84: 194–198
- Baccan, G. C., Ferreira Falleiros, A. M., Cavazzana Jr., M., Jankevicius, J. V., Attias, M., de Souza, W. & Itow Jankevicius, S. (2001). *Veneza zonata* (Hemiptera: Coreidae)/trypanosomatid relationship: action of hemolymph *in vitro* and experimental infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 158–164
- Batistoti, M., Cavazzana Jr., M., Serrano, M. G., Ogatta, S. F., Baccan, G. C., Jankevicius, J. V., Teixeira, M. M. G. & Jankevicius, S. I. (2001). Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. *Journal of Parasitology*, 87: 1335–1341
- Beard, C. B., Butler, J. F. & Greiner, E. C. (1989). In vitro growth characterization and host-parasite relationship of *Leptomonas pulexsimulantis* n. sp., a trypanosomatid flagellate of the flea, *Pulex simulans*. *Journal of Parasitology*, 75: 658–668
- Becker, E. R. (1923a). Observations on the Morphology and Life Cycle of *Crithidia gerridis* Patton in the Water-Strider, *Gerris remigis* Say. *The Journal of Parasitology*, 9: 141–152
- Becker, E. R. (1923b). Observations on the Morphology and Life History of *Herpetomonas muscaedomesticae* in North American Muscoid Flies. *The Journal of Parasitology*, 9: 199–213
- Berriman, M. a kol. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309: 416–422
- Blom, D., de Haan, A., van den Berg, M., Sloof, P., Jirků, M., Lukeš, J. & Benne, R. (1998). RNA editing in the free-living bodonid *Bodo saltans*. *Nucleic Acids Research*, 26: 1205–1213
- Booth, C. L. (1990). Biology of *Largus californicus* (Hemiptera: Largidae). *The Southwestern Naturalist*, 35: 15–22
- Bruzik, J. P., Van Doren, K., Hirsh, D. & Steitz, J. A. (1988). Trans splicing involves a novel form of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Nature*, 335: 559–562
- Callahan, H., Litaker, R. W. & Noga, E. J. (2002). Molecular taxonomy of the suborder Bodonina (Order Kinetoplastida), including the important fish parasite, *Ichthyobodo necator*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49: 119–128
- Camargo, E. P., Mattei, D. M., Barbieri, C. L. & Morel, C. M. (1982). Electrophoretic analysis of endonuclease-generated fragments of k-DNA, of esterase isoenzymes, and of surface proteins as aids for species identification of insects trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, 29: 251–258
- Campbell, D. A., Thomas, S. & Sturm, N. R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes and Infection*, 5: 1231–1240
- Carvalho, A. L. M. & Deane, M. P. (1974). Trypanosomatidae isolated from *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera: Reduviidae), with a discussion on flagellates of insectivorous bugs. *Journal of Protozoology*, 21: 5–8
- Catarino, L. M., Serrano, M. G., Cavazzana Jr., M., Almeida, M. L., Kaneshina, E. K., Campaner, M., Jankevicius, J. V., Teixeira, M. M. G. & Itow-Jankevicius, S. (2001). Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 201: 65–72
- Cavalier-Smith, T. (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems*, 14: 461–481
- Clark, T. B., Kellen, W. R., Lindgren, J. E. & Smith, T. A. (1964). The transmission of *Crithidia fasciculata* Leger 1902 in *Culiseta incidens* (Thomson). *Journal of Protozoology*, 11: 400–402

- Conchon, I., Campaner, M., Sbravate, C. & Camargo, E. P. (1989). Trypanosomatids other than *Phytomonas* spp. isolated and cultured from fruit. *Journal of Protozoology*, 36: 412-414
- Constant, J. (2007). Note on coprophily and necrophily in the Hemiptera Heteroptera. *Entomologie*, 77: 107-112
- Dacks, J. B. & Doolittle, W. F. (2001). Reconstructing/deconstructing the earliest eukaryotes: how comparative genomics can help. *Cell*, 107: 419-425
- Damgaard, J. (2008). Phylogeny of the semiaquatic bugs (Hemiptera-Heteroptera, Gerromorpha). *Insect Systematics and Evolution*, 39: 431-460.
- De Souza, W. & Motta, M. C. M. (1999). Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. *FEMS Microbiology Letters*, 173: 1-8
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P. & Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. *Nature Reviews*, 3: 251-261
- Du, Y., Maslov, D. A. & Chang, K.-P. (1994b). Monophyletic origin of  $\beta$ -division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 91: 8437-8441
- Du, Y., McLaughlin, G. & Chang, K.-P. (1994a). 16S ribosomal DNA sequence identities of  $\beta$ -proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species. *Journal of Bacteriology*, 176: 3081-3084
- Durrer, S. & Schmid-Hempel, P. (1994). Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B-Biological Sciences*, 258: 299-302
- Duží, I. (2007). Ptačí blechy jako hostitelé jedno a vícehostitelských trypanosomatid. Diplomová práce, 1-124
- Dyková, I., Fiala, I., Lom, J. & Lukeš, J. (2003). *Perkinsiella amoebae*-like endosymbionts of *Neoparamoeba* spp., relatives of the kinetoplastid Ichthyobodo. *European Journal of Protistology*, 39: 37-52
- Eichler, S. & Schaub, G. A. (2002). Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology*, 100: 17-27
- El-Sayed, N. M. a kol. (2005). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*, 309: 404-409
- Fampa, P., Corrêa-da-Silva, M. S., Lima, D. C., Oliveira, S. M. P., Motta, M. C. M. & Saraiva, E. M. B. (2003). Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. *International Journal for Parasitology*, 33: 1019-1026
- Finlay, B. J. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, 296: 1061-1063
- Fiorini, J. E., Takata, C. S. A., Teofilo, V. M., Nascimento, L. C., Faria-e-silva, P. M., Soares, M. J., Teixeira, M. M. G. & de Souza, W. (2001). Morphological, biochemical and molecular characterization of *Herpetomonas samuelpeessoai camrgoi* n. subsp., a trypanosomatid isolated from the flower of squash *Cucurbita moschata*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48: 62-69
- Foissner, W. (2006). Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica*, 45: 111-136
- Fox, L. R. (1975). Cannibalism in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 6: 87-106
- Frey Müller, E. & Camargo, E. P. (1981). Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. *Journal of Protozoology*, 28: 175-182
- Frolov, A. O. (1987). The life-history of *Leptomonas pyrrocoris* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Zoologicheskyy Zhurnal*, 66: 5-11 (rusky s anglickým shrnutím)
- Frolov, A. O. & Malysheva, M. N. (1992). The endomastigotes, a special type of the transmission stages of trypanosomatides of the genus *Proteomonas*. *Parazitologiya*, 26: 351-355 (rusky s anglickým shrnutím)



- Frolov, A. O. & Skarlato, S. O. (1990). In vitro differentiation of cyst-like cells in *Leptomonas mycophilus*. *Tsitologia*, 32: 985–992 (rusky s anglickým shrnutím)
- Frolov, A. O., Skarlato, S. O. & Shaglina, E. G. (1991). Morphology of cyst-like cells in the flagellate *Leptomonas jaculum*. *Tsitologia*, 33: 55–58 (rusky s anglickým shrnutím)
- Gadelha, C., Wickstead, B., de Souza, W., Gull, K. & Cunha-e-Silva, N. (2005). Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. *Eukaryotic Cell*, 4: 516–525
- Galková, Z. (2010). Tiplíci jako přenašeči infekčních onemocnění a jejich výskyt na území ČR. Diplomová práce, 1–122
- Gao, G., Kapushoc, S. T., Simpson, A. M., et al. (2001). Guide RNAs of the recently isolated LEM125 strain of *Leishmania tarantolae*: an unexpected complexity. *RNA*, 7: 1335–1347
- Gibbs, A. J. (1950). *Crithidia familiaris* n. sp. in *Canaeus carnifex* Fabr. (Hemiptera). *Parasitology*, 40: 322–327
- Gibbs, A. J. (1951). *Crithidia sandoni* sp. nov., in *Holopterna alata* (Hemiptera). *The Journal of Parasitology*, 37: 587–593
- Godoi, M. M. I., Serrano, M. G., Teixeira, M. M. G. & Camargo, E. P. (2002). A PCR-based survey on *Phytomonas* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) in phytophagous hemipterans of the Amazon region. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49: 275–279
- Gonçalves de Lima, V. M. Q., Roitman, I. & dos Santos Alves, C. (1982). Comparison of six isoenzymes from 10 species of *Crithidia*. *Journal of Protozoology*, 29: 397–401
- Grazia, J., Schuh, R. T. & Wheeler, W. C. (2008). Phylogenetic relationships of family groups in Pentatomoidea based on morphology and DNA sequences (Insecta: Heteroptera). *Cladistics*, 24: 1–45
- Gurski, K. C. & Ebbert, M. A. (2003). Host age, but not host location within a stream, is correlated with the prevalence of gut parasites in water striders. *Journal of Parasitology*, 89: 529–534
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gaunt, M. W., Gidley, J. & Gibson, W. C. (2004). Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*, 34: 1393–1404
- Hannaert, V., Opperdoes, F. R. & Michels, P. A. M. (1998). Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *Journal of Molecular Evolution*, 47: 728–738
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R. & Michels, P. A. M. (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2: 11
- Hebsgaard, M. B., Andersen, N. M. & Damgaard, J. (2004). Phylogeny of the true water bugs (Nepomorpha: Hemiptera-Heteroptera) based on 16S and 28S rDNA and morphology. *Systematic Entomology*, 29:488–508
- Henry, T.J. (1997). Phylogenetic analysis of family groups within the infraorder Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera), with emphasis on the Lygaeoidea. *Annals of the Entomological Society of America*, 90, 275–301
- Hoare, C. A. & Wallace, F. G. (1966). Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*, 212: 1385–1386
- Hollar, L. & Maslov, D. A. (1997). A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 89: 295–299
- Hollar, L., Lukeš, J. & Maslov, D. A. (1998). Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45 (3): 293–297
- Honigberg, B. M. (1963). A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In *Progress in Protozoology*, p. 68. Ed. Ludvik, J., Lom, J. & Vávra, J., New York: Academic Press
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Meng, X. Y. & Fukatsu, T. (2005). The making of symbiont capsule in the plataspid stink bug *Megacopta punctatissima*. *FEMS Microbiology Ecology*, 54: 471–477
- Hughes, A. L. & Piontkivska, H. (2003a). Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: Evidence for paraphyly of Trypanosoma and six other genera, *Molecular Biology and Evolution*, 20: 644–652

- Hughes, A. L. & Piontkivska, H. (2003b). Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2: 15
- Chang, K. P., Chang, C. S. & Sassa, S. (1975). Heme biosynthesis in bacterium-protazoan symbioses: enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbiotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72: 2979–2983
- Chicharro, C. & Alvar, J. (2003). Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97, sup.1: S75–S78
- Ivens, A. C. & coll. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309: 436–442
- Jankevicius, S. I., de Almeida, M. L., Jankevicius, J. V., Cavazzana JR., M., Attias, M. & de Souza, W. (1993). Axenic cultivation of trypanosomatids found in corn (*Zea mays*) and in phytophagous hemipterans (*Leptoglossus zonatus* Coreidae) and their experimental transmission. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40: 576–581
- Jensen, C., Schaub, G. A. & Molyneux, D. H. (1990). The effect of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the midgut of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Parasitology*, 100: 1–9
- Klingenberg, C. P., Leigh, R. H. B., Keddie, B. A. & Spence, J. R. (1997). Influence of gut parasites on growth performance in the water strider *Gerris buenoi* (Hemiptera: Gerridae). *Ecography*, 20: 29–36
- Kořený, L., Lukeš, J. & Oborník, M. (2010). Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? *International Journal for Parasitology*, 40: 149–156
- Kostygov, A. Y., Slisarenko, E. P., Merkulov, P. A. & Podlipaev, S. A. (2004). Genetic diversity of insect trypanosomatids from subarctic and North-West Russia revealed by UP-PCR typing. *Protistology*, 3: 257–264
- Laugé, G. & Nishioka, R. S. (1977). Ultrastructural study of the relations between *Leptomonas oncopelti* (Noguchi & Tilden), protozoa Trypanosomatidae, and the rectal wall of adults of *Oncopeltus fasciatus* Dallas, Hemiptera Lygaeidae. *Journal of Morphology*, 154: 291–306
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E. C. & Englund, P. T. (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*, 21: 363–369
- Lukeš, J., Jirků, M., Doležel, D., Kral'ová, I., Hollar, L. & Maslov, D. A. (1997). Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *Journal of Molecular Evolution*, 44: 521–527
- Lukeš, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R. & Englund, P. T. (2002). Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*, 1: 495–502
- Lukeš, J., Hashimi, H. & Zíková, A. (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current Genetics*, 48: 277–299
- Lukeš, J., Leander, B. S. & Keeling, P. J. (2009). Cascades of convergent evolution: the corresponding evolutionary histories of euglenozoans and dinoflagellates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 9963–9970
- Mair, G., Ullu, E. & Tschudi, C. (2000). Contrascriptonal cap 4 formation on the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 28 994–28 999
- Malysheva, M. N., Frolov, A. O. & Skarlato, S. O. (2006). Development of cyst-like cells of the flagellate *Leptomonas oncopelti* in the midgut of the hemipteran *Oncopeltus fasciatus*. *Cytologia*, 48: 723–733 (rusky s anglickým shrnutím)
- Mandelboim, M., Lopez Estraña, C., Tschudi, C., Ullu, E. & Michaeli, S. (2002). On the role of exon and intron sequences in *trans*-splicing utilization and cap 4 modification of the trypanosomatid *Leptomonas collosoma* SL RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 35210–35218
- Marín, C., Fabre, S., Sánchez-Moreno, M. & Dollet, M. (2007). *Herpetomonas* spp. isolated from tomato fruits (*Lycopersicon esculentum*) in southern Spain. *Experimental Parasitology*, 116: 88–90

- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. & Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 525241
- Maslov, D. A., Lukeš, J., Jirků, M. & Simpson, L. (1996). Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: Implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75: 197–205
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A. & Lukeš, J. (2001). Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (3): 397–402
- Maslov, D. A., Westenberger, S. J., Xu, X., Campbell, D. A. & Sturm, N. R. (2007). Discovery and barcoding by analysis of spliced leader RNA gene sequences of new isolates of Trypanosomatidae from Heteroptera in Costa Rica and Ecuador. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54: 57–65
- Maslov, D. A., Yurchenko, V., Jirků, M. & Lukeš, J. (2010). Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica shed more light on the diversity and evolution of the Trypanosomatidae. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57: 177–188
- Matkin, A., Das, A. & Bellofatto, V. (2001). The *Leptomonas seymouri* spliced leader RNA promoter requires a novel transcription factor. *International Journal for Parasitology*, 31: 545–549
- McGhee, R. B. & Hanson, W. L. (1962). Growth and reproduction of *Leptomonas oncopelti* in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of Protozoology*, 9: 488–493
- McGhee, R. B. & Cosgrove, W. B. (1980). Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiological Reviews*, 44: 140–173
- Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S. & Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71 (2): 491–499
- Merzlyak, E., Yurchenko, V., Kolesnikov, A. A., Alexandrov, K., Podlipaev, S. A. & Maslov, D. A. (2001). Diversity and phylogeny of insect Trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48: 161–169
- Miranda, K., Docampo, R., Grillo, O. & de Souza, W. (2004). Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition. *Protist*, 155: 395–405
- Molyneux, D. H. & Croft, S. L. (1980). Studies on the ultrastructure of candidate „cysts“ in *Leptomonas* species of Siphonaptera. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 63: 233–239
- Momen, H. (2001). Some current problems in the systematics of trypanosomatids. *International Journal for Parasitology*, 31: 640–642
- Moraes, R. M., Freymüller, E., Camargo, E. P. & Milder, R. (1994). Development of trypanosomatids in the phytophagous insect *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). A light and electron microscopis study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 553–559
- Moreira, D., López-García, P. & Vickerman, K. (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1861–1875
- Morio, F., Reynes, J., Dollet, M. a kol. (2008). Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 46: 3845–3847
- Motta, M. C., Picchi, G. F., Palmié-Peixoto, I. V., Rocha, M. R., de Carvalho, T. M., Morgado-Diaz, J., de Souza, W., Goldenberg, S. & Fragosso, S. P. (2004). The microtubule analog protein FtsZ in the endosymbiont of trypanosomatid protozoa. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51: 394–401
- Mottram, J., Perry, K. L., Lizardi, P. M., Lahrmann, R., Agabian, N. & Nelson, R. G. (1989). Isolation and sequence of four small nuclear U RNA genes of *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei*: identification of the U2, U4 and U6 RNA analogs. *Molecular and Cellular Biology*, 9: 1212–1223
- Murthy, V. K., Dibbern, K. M. & Campbell, D. A. (1992). PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Molecular and Cellular Probes*, 6: 237–243

- Nilsen, T. W. (2001). Evolutionary origin of SL-addition trans-splicing: still an enigma. *Trends in Genetics*, 17 (12): 678–680
- Noyes, H. A., Arana, B. A., Chance, M. L. & Maingon, R. (1997). The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44: 511–517
- Ohba, S., Hidaka, K. & Sasaki, M. (2006). Notes on paternal care and sibling cannibalism in the giant water bug, *Lethocerus deyrolli* (Heteroptera: Belostomatidae). *Entomological Science*, 9: 1–5
- Otterstatter, M. C. & Thomson, J. D. (2007). Contact networks and transmission of an intestinal pathogen in bumble bee (*Bombus impatiens*) colonies. *Oecologia*, 154: 411–421
- Peng, P. L. M. & Wallace, F. G. (1982). The cysts of *Blastocrithidia triatomae* Cerisola et al., 1971. *Journal of Protozoology*, 29: 464–467
- Podlipaev, S. A. (1990). Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). *Proceedings of the Zoological Institute Leningrad*, 144: 1–174
- Podlipaev, S. A. (2000). Insect trypanosomatids: the need to know more. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 517–522
- Podlipaev, S. A. (2001). The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. *International Journal for Parasitology*, 31: 648–652
- Podlipaev, S. A., Sturm, N. R., Fiala, I., Fernandes, O., Westenberger, S. J., Dollet, M., Campbell, D. A. & Lukeš, J. (2004a). Diversity of insect trypanosomatids assessed from the spliced leader RNA and 5S rRNA genes and intergenic regions. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51: 283–290
- Podlipaev, S. A., Votýpka, J., Jirků, M., Svobodová, M. & Lukeš, J. (2004b). *Herpetomonas ztiplika* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): a parasite of the blood-sucking biting midge *Culicoides kibunensis* Tokunaga, 1937 (Diptera: Ceratopogonidae). *The Journal of Parasitology*, 90: 342–347
- Porter, A. (1909). The life-cycle of *Herpetomonas jaculum* (Léger), parasitic in the alimentary tract of *Nepa cinerea*. *Parasitology*, 2: 367–391
- Prado, S. S., Rubinoff, D. & Almeida, R. P. P. (2006). Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. *Annals of the Entomological Society of America*, 99: 577–585
- Reduth, D. & Schaub, G. A. (1988). The ultrastructure of the cysts of *Blastocrithidia triatomae* Cerisola et al. 1971 (Trypanosomatidae): A freeze-fracture study. *Parasitology Research*, 74: 301–306
- Roberts, L. S. & Janovy Jr., J. (2005). Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. *Colin H. Wheatley*, 7th edition: 61–88
- Robinson, D. R. & Gull, K. (1991). Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature*, 352: 731–733
- Romeiro, A., Solé-Cava, A., Sousa, M. A., de Souza, W. & Attias, M. (2000). Ultrastructural and biochemical characterization of promastigote and cystic forms of *Leptomonas wallacei* n. sp. isolated from the intestine of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47: 208–220
- Romeiro, A., Monteiro Leal, L. H., de Souza, W. & Attias, M. (2003). Interaction of *Leptomonas wallacei* with the intestinal tract of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 82: 41–49
- Roy, J., Faktorová, D., Lukeš, J. & Burger, G. (2007). Unusual mitochondrial genome structures throughout the Euglenozoa. *Protist*, 158: 385–396
- Sánchez-Moreno, M., Fernández-Becerra, C., Fernández-Ramos, C., Luque, F., Rodríguez-Cabezas, M. N., Dollet, M. & Osuna, A. (1998). Trypanosomatid protozoa in plants of southeastern Spain: characterization by analysis of isoenzymes, kinetoplast DNA, and metabolic behavior. *Parasitology Research*, 84: 354–361
- Santos, A. L. S., Abreu, C. M., Alviano, C. S. & Soares, R. M. A. (2005). Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology*, 130: 79–88

- Sbravate, C., Campaner, M., Camargo, L. E. A., Conchon, I., Teixeira, M. M. G. & Camargo, E. P. (1989). Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous hemiptera in Brazil. *Journal of Protozoology*, 36: 543–547
- Shapiro, T. A. & Englund, P. T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, 49: 117–143
- Shapiro, T. A. (1993). Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 90: 7809–7813
- Schaub, G. A. & Meiser, A. (1990). Presence of undigested haemoglobin in the small intestine and haemolymph of *Triatoma infestans* (Reduviidae) infected with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae). *Parasitology Research*, 76: 724–725
- Schaub, G. A. & Pretsch, M. (1981). Ultrastructural studies on the excystment of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae). *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 168–171
- Schaub, G. A. (1988). Developmental time and mortality in larvae of the reduviid bugs *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* after coprophagic infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 51: 23–31
- Schaub, G. A. (1990). The effect of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the reduviida bug *Triatoma infestans*: influence of group size. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56: 249–257
- Schaub, G. A. (1994). Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitology Today*, 10: 463–468
- Schaub, G. A., Böker, C. A., Jensen, C. & Reduth, D. (1989). Cannibalism and coprophagy are modes of transmission of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) between Triatomines. *Journal of Protozoology*, 36: 171–175
- Schaub, G. A., Neukirchen, K. & Golecki, J. (1992). Attachment of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) by flagellum and cell body in the midgut of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *European Journal of Protistology*, 28: 322–328
- Schaub, G. A., Schmidt, A. & Ullrich, J. (1990). The effect of moulting and of infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the concentration of free amino acids in the haemolymph of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology*, 36: 843–853
- Schlegel, M. (1994). Molecular phylogeny of eukaryotes. *Tree*, 9: 330–335
- Schuh, R. T., Weirauch, C. & Wheeler, W. C. (2009). Phylogenetic relationships within the Cimicomorpha (Hemiptera: Heteroptera): a total-evidence analysis. *Systematic Entomology*, 34: 15–48
- Schuh, R.T. & Slater, J.A. (1995). True bugs of the world (Hemiptera: Heteroptera). Classification and natural history. Cornell University Press, Ithaca, London, 336 pp.
- Simpson, L., Thiemann, O. H., Savill, N. J., Alfonso, J. D. & Maslov, D. A. (2000). Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (13): 6986–6993
- Simpson, A. G. B., Lukeš, J. & Roger, J. (2002). The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2071–2083
- Simpson, A. G. B., Gill, E. E., Callahan, H. A., Litaker, R. W. & Roger, A. J. (2004). Early evolution within Kinetoplastids (Euglenozoa), and the late emergence of Trypanosomatids. *Protist*, 155: 407–422
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. & Lukeš, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*, 22: 168–174
- Stoeck, T., Schwarz, M. V. J., Boenigk, J., Schweikert, M., von der Heyden, S. & Behnke, A. (2005). Cellular identity of an 18S rRNA gene sequence clade within the class Kinetoplastea: the novel genus *Actuariola* gen. nov. (Nebodonida) with description of the type species *Actuariola framvarensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 2626–2635
- Stuart, K. D., Schnauffer, A., Ernst, N. L. & Panigrahi, A. K. (2005). Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 30: 97–105
- Sturm, N. R., Yu, M. C. & Campbell, D. A. (1999). Transcription termination and 3' end processing of the spliced-leader RNA in kinetoplastids. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (2): 1595–1604

- Suková, E. (2009). Jednohostitelská trypanosomatida blech. Diplomová práce, 1–119
- Svobodová, M., Zídková, L., Čepička, I., Oborník, M., Lukeš, J. & Votýpka, J. (2007). *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratomyzidae, Diptera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 423–432
- Takata, C. S. A., Camargo, E. P. & Milder, R. V. (1996). Encystment and excystment of a trypanosomatid of the genus *Leptomonas*. *European Journal of Protistology*, 32: 90–95
- Teixeira, M. M. G., Serrano, M. G. & Camargo, E. P. (2000). New data from old trypanosomatid preparations. *Parasitology Today*, 16: 261–263
- Tieszen, K. L. & Molyneux, D. H. (1989a). Morphology and host-parasite relationships of *Crithidia flexonema* (Trypanosomatidae) in the hindgut and malpighian tubules of *Gerris odontogaster* (Hemiptera: Gerridae). *Journal of Parasitology*, 75: 441–448
- Tieszen, K. L. & Molyneux, D. H. (1989b). Transmission and ecology of trypanosomatid flagellates of water striders (Hemiptera: Gerridae). *Journal of Protozoology*, 36: 519–523
- Tieszen, K., Heywood, P. & Molyneux, D. H. (1983). Ultrastructure and host-parasite association of *Blastocrithidia gerridis* in the ventriculus of *Gerris odontogaster* (Gerridae: Hemiptera). *Canadian Journal of Zoology*, 61: 1900–1909
- Tieszen, K., Molyneux, D. H. & Abdel-Hafez, S. K. (1985). Ultrastructure of cyst formation in *Blastocrithidia familiaris* in *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 71: 179–188
- Tieszen, K. L., Molyneux, D. H. & Abdel-Hafez, S. K. (1986). Host-parasite relationships of *Blastocrithidia familiaris* in *Lygaeus pandurus* Scop. (Hemiptera: Lygaeidae). *Parasitology*, 92: 1–12
- Tieszen, K. L., Molyneux, D. H. & Abdel-Hafez, S. K. (1989). Host-parasite relationships and cysts of *Leptomonas lygaei* (Trypanosomatidae) in *Lygaeus pandurus* (Hemiptera: Lygaeidae). *Parasitology*, 98: 395–400
- Vercesi, A. E., Moreno, S. N. J. & Docampo, R. (1994). Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal*, 304: 227–233
- Vickerman, K. (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International Journal for Parasitology*, 24: 1317–1331
- Vickerman, K. (2000). Order Kinetoplastea Honigberg, 1963. In: *An illustrated Guide to the Protozoa*, ed: Lee, J. J., Leedale, G. F. & Bradbury, P. (Allen Press). p. 1159–1185
- Votýpka J., Oborník M., Volf P., Svobodová M. & Lukeš J. (2002). *Trypanosoma avium* of raptors (*Falconiformes*): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*, 125: 253–263
- Votýpka, J., Maslov, D. A., Yurchenko, V., Jirků, M., Kment, P., Lun, Z. R. & Lukeš, J. (2010). Probing into the diversity of trypanosomatid flagellates parasitizing insect host in South-West China reveals both endemism and global dispersal. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 243–253
- Wachmann, E., Melber, A. & Deckert, J. (2004). Wanzen 2 – Die Tierwelt Deutschlands, Keltern: Goecke & Evers, 75: 1–294
- Wachmann, E., Melber, A. & Deckert, J. (2006). Wanzen 1 – Die Tierwelt Deutschlands, Keltern: Goecke & Evers, 77: 1–263
- Wachmann, E., Melber, A. & Deckert, J. (2007). Wanzen 3 – Die Tierwelt Deutschlands, Keltern: Goecke & Evers, 78: 1–272
- Wachmann, E., Melber, A. & Deckert, J. (2008). Wanzen 4 – Die Tierwelt Deutschlands, Keltern: Goecke & Evers, 81: 1–230
- Wallace, F. G. (1966). The Trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Experimental Parasitology*, 18: 124–193
- Wallace, F. G., Camargo, E. P., McGhee, R. B. & Roitman, I. (1983). Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, 30: 308–313
- Weiss, M. R. (2006). Defecation behavior and ecology of insects. *Annual Reviews of Entomology*, 51: 635–661

- Westenberger, S. J., Sturm, N. R., Yanega, D., Podlipaev, S. A., Zeledón, R., Campbell, D. A. & Maslov, D. A. (2004). Trypanosomatid biodiversity in Costa Rica: genotyping of parasites from Heteroptera using the spliced leader RNA gene. *Parasitology*, 129: 537–547
- Wheeler, A. G. & Skaftason, J. F. (2010). Notes on the feeding behavior of *Teratocoris saundersi* (Hemiptera: Miridae) in Iceland: phytophagy, zoology, and adventitious biting. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 50: 45–52
- Yoshida, N. & Camargo, E. P. (1978). Ureotelism and ammonotelism in trypanosomatids. *Journal of Bacteriology*, 136: 1184–1186
- Yurchenko, V. Y., Lukeš, J., Xu, X. & Maslov, D. A. (2006a). An integrated morphological and molecular approach to a new species description in the Trypanosomatidae: the case of *Leptomonas podlipaevi* n. sp., a parasite of *Boisea rubrolineata* (Hemiptera: Rhopalidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53: 103–111
- Yurchenko, V. Y., Lukeš, J., Jirků, M., Zeledón, R. & Maslov, D. A. (2006b). *Leptomonas costaricensis* sp. n. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae), a member of the novel phylogenetic group of insect trypanosomatids closely related to the genus *Leishmania*. *Parasitology*, 133: 537–546
- Yurchenko, V. Y., Lukeš, J., Tesařová, M., Jirků, M. & Maslov, D. A. (2008). Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. *Protist*, 159: 99–114
- Yurchenko, V. Y., Lukeš, J., Jirků, M. & Maslov, D. A. (2009). Selective recovery of the cultivation-prone components from mixed trypanosomatid infections: a case of several novel species isolated from Neotropical Heteroptera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 893–909
- Zídková, L., Čepička, I., Votýpka, J. & Svobodová, M. (2010). *Herpetomonas trimorpha* sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), parasite of the biting midge *Culicoides truncorum* (Ceratopogonidae, Diptera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: in press