

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



## **Evoluce genetického kódu a taxonomie oxymonád**

### **Evolution of the genetic code and classification of oxymonads**

Bc. Eliška Šrámová

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Vladimír Hampl, Ph.D.

Praha, 2012

**Prohlášení:**

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

V Praze, 27. 8. 2012

Eliška Šrámová

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Vladimíru Hamplovi, PhD. za odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph.D. za pomoc při tvorbě preparátů, Mgr. Pavle Smejkalové a všem členům našeho týmu za pomoc v laboratoři, ale i za vytvoření přátelské atmosféry a psychickou podporu.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu a trpělivost během doby mého studia.

## OBSAH

1	ABSTRAKT .....	6
2	ABSTRACT .....	7
3	ÚVOD.....	8
4	CÍLE PRÁCE .....	9
5	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	10
5.1	Obecná charakteristika oxymonád .....	10
5.2	Taxonomické zařazení a morfologie oxymonád.....	14
5.2.1	Čeleď Polymastigidae.....	15
5.2.2	Čeleď Streblomastigidae .....	18
5.2.3	Čeleď Saccinobaculidae .....	19
5.2.4	Čeleď Oxymonadidae.....	21
5.2.5	Čeleď Pyronymphidae .....	23
5.3	Evoluce genetického kódu .....	24
5.3.1	Nekanonický genetický kód u oxymonád .....	25
6	MATERIÁL A METODY.....	27
6.1	Původ zkoumaného materiálu.....	27
6.1.1	Složení a příprava kultivačních médií .....	27
6.1.2	Kultivace anaerobních prvoků.....	29
6.1.3	Zmrazování .....	29
6.2	Izolace DNA .....	30
6.3	Amplifikační reakce a elektroforéza.....	30
6.3.1	Amplifikace DNA.....	30
6.3.2	Amplifikace $\alpha$ -TUBULINU .....	33
6.3.3	Elektroforéza amplifikované DNA.....	34
6.4	Purifikace PCR produktů.....	34
6.5	Klonování do kompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> .....	35
6.5.1	Příprava ligační reakce .....	35
6.5.2	Transformace buněk .....	35
6.5.3	Colony PCR a izolace plasmidů .....	36
6.6	Sekvence DNA.....	38
6.7	Skládání sekvencí a fylogenetické analýzy.....	40
6.7.1	Tvorba a úprava alignmentu .....	40
6.7.2	Tvorba fylogenetických stromů.....	41
6.7.3	Testování monofylie rodu <i>Monocercomonoides</i> .....	41
6.8	Morfologie .....	42
7	VÝSLEDKY .....	43
7.1	Izoláty DNA.....	43
7.2	Morfologie a druhová determinace izolátů .....	44
7.3	Příbuzenské vztahy mezi izoláty.....	49
7.4	Genetický kód .....	51
8	DISKUZE .....	54
8.1	Získávání nových sekvencí .....	54

8.2	Molekulárně-fylogenetické analýzy.....	55
8.3	Morfologie izolátů rodu <i>Monocercomonoides</i> .....	56
8.4	Variabilita genetického kódu .....	57
9	ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ .....	59
10	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	60
11	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	61

# 1 ABSTRAKT

Oxymonády jsou skupinou heterotrofních bičíkvců žijících v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku. Tito prvoci se vyskytují především ve střevě xylofágního hmyzu (švábi, termiti), ale výjimku tvoří rod *Monocercomonoides*, který byl popsán ze střevního obsahu mnoha obratlovců. Na základě molekulárních dat je řád Oxymonadida řazen do říše Excavata (Cavalier-Smith, 2002; Simpson a kol., 2006, Hampl a kol. 2009).

Tato práce byla zaměřena na studium rozmanitosti rodu *Monocercomonoides* náležejícího do morfologicky nejjednodušší čeledi *Polymastigidae*. Hlavním cílem bylo získat sekvenční data z co největšího počtu kmenů tohoto rodu z širokého spektra hostitelů. Celkem se nám podařilo získat 26 sekvencí části genu pro SSU rDNA, z čehož dvě sekvence náleželi jiné oxymonádě, zřejmě rodu *Oxymonas*. Naše fylogenetická analýza sice naznačila, že zástupci rodu *Monocercomonoides* tvoří jednu skupinu, avšak s nízkou bootstrapovou hodnotou.

Na základě publikovaných dat o přítomnosti nekanonického genetického kódu u některých zástupců oxymonád (Keeling a Leander, 2003; de Koning a kol., 2008), jsme se rozhodli tento vzácný jev blíže prozkoumat u prvoků rodu *Monocercomonoides*. Pro tuto část studie jsme získali 9 částečných sekvencí genu pro  $\alpha$ -tubulin. V těchto částečných sekvencích jsme nepozorovali projev nekanonického genetického kódu.

**Klíčová slova:** *Monocercomonoides*, *Polymastigidae*, *Oxymonas*, SSU rDNA,  $\alpha$ -tubulin, nekanonický genetický kód

## 2 ABSTRACT

Oxymonads are a group of heterotrophic flagellates living in low oxygen environment. These protists inhabit mainly the gut of xylophagous insects (cockroaches, termites), with an exception of the genus *Monocercomonoides*, which was described from the intestinal contents of many vertebrates. On the basis of molecular data, Oxymonadida are classified into the supergroup Excavata (Cavalier-Smith, 2002; Simpson et al., 2006, Hampl et al. 2009).

This thesis was focused on the diversity of genus *Monocecomonoides* from the morphologically simplest family *Polymastigidae*. The main goal of our work was to gather sequence data from strains isolated from a wide spectrum of hosts. We have obtained 26 partial sequences of the gene for the SSU rDNA in total, of which two belonged to another oxymonad, apparently genus *Oxymonas*. Our phylogenetic analysis indicated that the representatives of the genus *Monocercomonoides* form one group, however with a low bootstrap support.

On the basis of published data about the presence of non-canonical genetic code in some oxymonads (Keeling and Leander, 2003; de Koning et al., 2008), we decided to explore this rare phenomenon in representatives of the genus *Monocercomonoides*. For this part of the study we gathered 9 partial sequences of  $\alpha$ -tubulin gene. In these sequences we have not observed the use of non-canonical genetic code.

**Key words:** *Monocercomonoides*, *Polymastigidae*, *Oxymonas*, SSU rDNA,  $\alpha$ -tubulin, non-canonical genetic code

### 3 ÚVOD

Oxymonády jsou velice málo studovanou skupinou a jejich taxonomické zařazení bylo po dlouhou dobu nejisté (Dacks a Roger, 1999; Noriya a kol., 1998, 2001). Informací o diverzitě této skupiny je také velmi málo a platí to obzvláště pro zástupce morfologicky nejjednodušší čeledi Polymastigidae – v databázi sekvencí je pouze jediná sekvence patřící rodu *Monocercomonoides*. Bylo sice popsáno přes 30 druhů tohoto rodu, a však mnoho popisů je nevěrohodných a k žádnému druhu nejsou přiřazena molekulární data. V naší laboratoři se nám podařilo shromáždit poměrně obsáhlou sbírku kmenů rodu *Monocercomonoides*, a proto jsme se rozhodli využít tento materiál pro studium diverzity tohoto rodu.

Oxymonády jako skupina jsou velice zajímavé z mnoha hledisek, nebyla u nich pozorována mitochondrie ani Golgiho komplex, u některých nebylo pozorováno pohlavní rozmnožování, zatímco jiné prodělávají pozoruhodné pohlavní cykly. V neposlední řadě je tato skupina atraktivní výskytem odchylek od standardního genetického kódu. Ty byly pozorovány u čeledi Strebloplastigidae a několika zástupců považovaných za členy rodu *Monocercomonoides*. Abychom prohloubili informace o tomto jevu, rozhodli jsme se prozkoumat výskyt těchto odchylek u zástupců naší sbírky.



## 4 CÍLE PRÁCE

- Shromáždit kultury kmenů rodu *Monocercomonoides* pro sbírku PřF UK.
- Osekvenovat a analyzovat sekvence genu pro SSU rDNA u kmenů rodu *Monocercomonoides* z dostupných izolátů DNA nebo kultur pocházejících z širokého spektra hostitelů a získat tak první molekulární data o diverzitě tohoto rodu.
- Získat a analyzovat sekvence genu pro  $\alpha$ -tubulin u kmenů rodu *Monocercomonoides* za účelem sledování výskytu nekanonického genetického kódu u zástupců tohoto rodu.
- Vypracovat morfologickou analýzu části pěstovaných kmenů rodu *Monocercomonoides*.

## 5 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 5.1 Obecná charakteristika oxymonád

Oxymonády jsou skupinou morfologicky různorodých, jednobuněčných symbiotických nebo endokomensálních bičíkovců (viz *Obr. 1*). Přírodním životním prostředím těchto heterotrofních protist je především střevní obsah xylofágního hmyzu, a to zejména švábů a termitů. Oxymonády tvoří značný podíl střevních symbiontů u hmyzích hostitelů (Yamin, 1979; Hausmann a Hülsmann, 1996). Některé zástupce oxymonád však najdeme také u obratlovců (Cleveland, 1938; Kulda a Nohýnková, 1978).

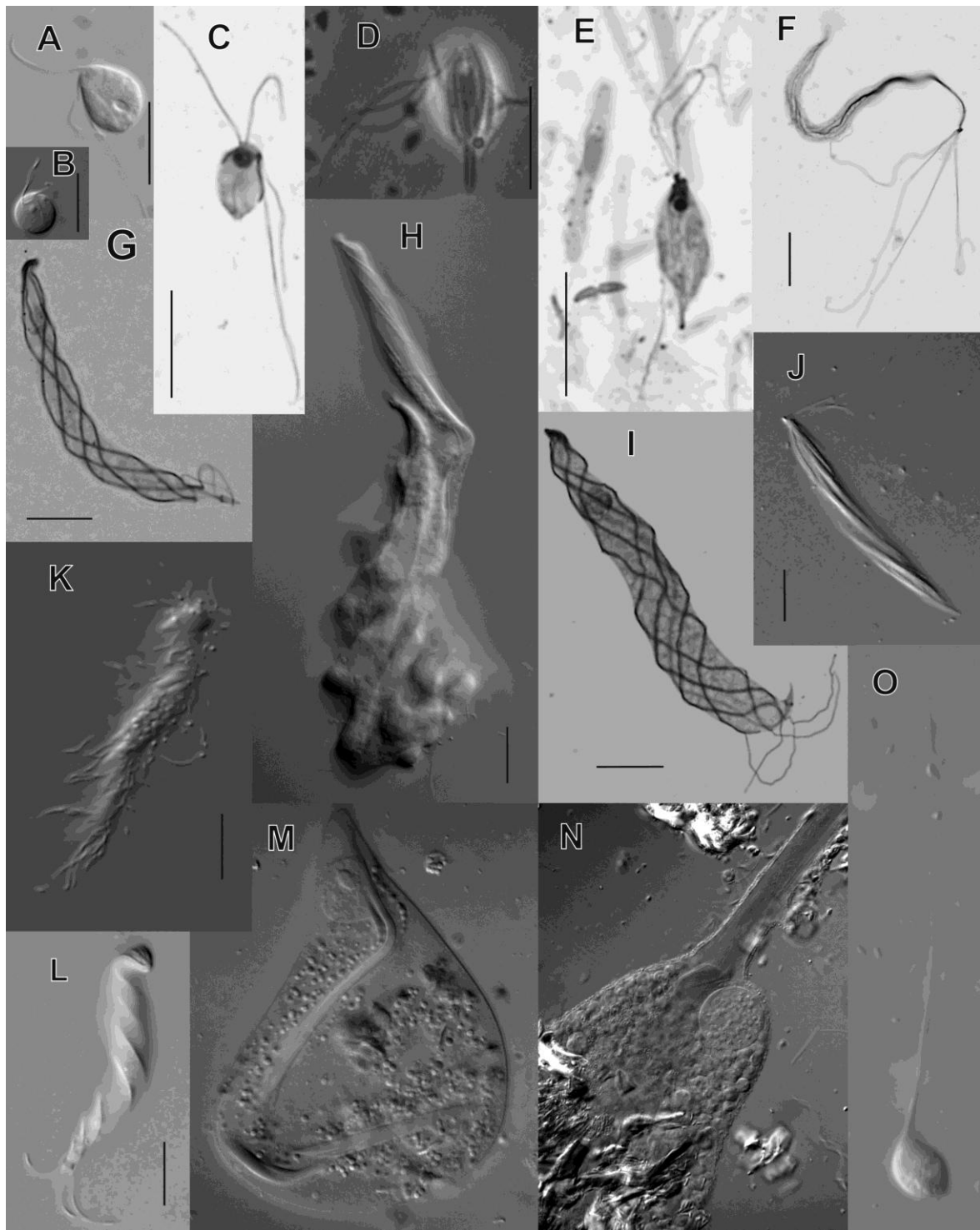
Dominantním životním stádiem v rámci buněčného cyklu těchto prvoků je stádium trofozoita. Buňky tohoto typu obvykle nesou čtyři bičíky uspořádané do dvou oddělených párů. Počet bičíků však není u všech zástupců stejný, například u některých rodů *Pyrsonympha* se počet bičíků znásobil na osm. Oxymonády rodu *Saccinobaculus* jich mají osm až dvanáct a, co se týče zmnožení bičíků, mezi naprosté vítěze patří rody *Microrhopalodina* nebo *Sauromonas*. Karyomastigont oxymonád je tvořen kromě bičíků také jádrem, preaxostylární laminou a parakrystaliním axostylem. U některých rodů jako například *Microohopalodina* nebo *Barroella* došlo ke zmnožení počtu karyomastigontů v buňce (Brugerolle a Lee, 2000). Pomocí elektronové mikroskopie bylo prokázáno, že trojrozměrný axostyl oxymonád je, na rozdíl od dutého axostylu parabasalidů, složený z paralelních řad vzájemně propojených mikrotubulů a u některých zástupců může být dokonce kontraktilní (Brugerolle a Müller, 2000). Jedinci rodů *Pyrsonympha* a *Saccinobaculus* se díky svému velkému kontraktilnímu axostylu stali předmětem výzkumu jeho molekulárních motorů (McIntosh, 1973).

Všem zástupcům chybí v jejich buněčné výbavě mitochondrie nebo peroxisomy, Golgiho aparát (Brugerolle, 1991) a také cytostom, ačkoliv malý kanálek bez zjevné potravní funkce je v některých případech přítomen (Simpson a kol., 2002b). Příjem živin probíhá tedy fagocytózou a pinocytózou, jako zásobní látku využívají oxymonády glykogen. U některých druhů se vyvinul přichycovací aparát „holdfast“ (mikrofibrilární povahy) a rostellum (mikrotubulární povahy), sloužící k přichycení na chitinózní stěnu střeva hmyzích hostitelů. Tito prvoci obývají především zadní část tzv. „hindgut“ nižších termitů a dřevokazných švábů (Brugerolle a Müller, 2000; Brugerolle a Lee, 2000a). Známe i druhy žijící ve střevě larev tiplic a listorohých brouků (*Polymastix*, *Monocercomonoides*), mnohonožek (*Polymastix*) a jak již bylo zmíněno i ve střevě

obratlovců (*Monocercomonoides*). Oxymonády termitů a dřevokazných švábů žijí často v symbióze společně s bakteriemi, parabasalidy a houbami v zadní části střeva hostitelů (Cleveland a kol., 1934; Grassé, 1952; Brugerolle a Lee, 2000b; Wenzel a kol., 2002). Tato společenství hrají významnou a nezastupitelnou roli v procesu trávení celulózy, a pokud dojde k usmrcení těchto mikroorganismů, hmyzí hostitel hyne během několika týdnů. Přesná úloha bičíkoců v procesu trávení celulózy není jasná (Radek, 1999; Li a kol., 2006; Brugerolle a Radek, 2006). Menší druhy se trávení celulózy pravděpodobně neúčastní, zatímco druhy rodu *Microrhopalodina*, *Oxymonas* a *Pyrsonympha*, podobně jako parabasalid *Trichonympha* fagocytují malé částičky dřeva (Honigberg, 1970, 1978; Yamin, 1978; Odelson a Breznak, 1985). Produkce celuláz byla zaznamenána u několika druhů parabasalidů (Yamin, 1981) ale prozatím u žádné oxymonády. Tyto enzymy jsou produkovány také termity a stejně jako enzymy parabasalidů zodpovídají za trávení celulózy (Li a kol., 2003).

Většina oxymonád má také své prokaryotické symbionty, kteří obývají jejich povrch a cytoplasmu. Bakterie vyskytující se na povrchu patří do skupiny *Spirochaetes* (Iida a kol., 2000; Noda a kol., 2003) a *Bacteroidales* (Noda a kol., 2006; Hongoh a kol., 2007), zatímco prokaryota přítomná v cytoplasmě náleží do skupiny Endomicrobia (TG-1), která jsou pro toto prostředí specifická (Stingl a kol., 2005; Yang a kol., 2005). Není nic zvláštního na tom, že občas dojde k fagocytóze ektobiotických bakterií hostitelem (Brugerolle, 1981; Leander a Keeling, 2004; Noda a kol., 2006).

Získávání informací o biochemii a molekulární genetice těchto organismů není jednoduché. Hlavním důvodem je nemožnost axenické kultivace většiny oxymonád. Jejich energetický metabolismus se zdá být podobný jiným studovaným anaerobům, jako je *Trichomonas*, *Giardia* nebo *Entamoeba* (Reeves a kol., 1977; Müller, 1992; Upcroft a Upcroft, 1998; Hampl a Simpson 2008). U rodu *Monocercomonoides* byla zjištěna poměrně vysoká exprese cystein protézy katepsinu B (Dacks a kol., 2008). Genom oxymonád je relativně bohatý na introny (1,1 intronů na gen u *Streblomastix*) na rozdíl od ostatních metamonád (*Giardia*, *Trichomonas*) (Slamovits a Keeling, 2006a). Hampl a Simpson (2008) uvádějí přítomnost genů pro [FeFe]hydrogenázu a pyruvát-ferredoxin oxidoreduktázu u rodu *Monocercomonoides*. Dále byly nalezeny geny pro proteiny fungující v Golgiho aparátu mezi EST sekvencemi rodu *Monocercomonoides* (Dacks a kol., 2007).



Obr.1. Morfologická rozmanitost oxymonád – protargolové a DIC snímky: A, B, C - *Monocercomonoides* sp. z čínčily; D - *Polymastix* sp. z *Parasphaeria boleiriana*; E - *Polymastix melolonthae* z larvy tiplice; F, J - *Streblomastix strix* ze *Zootermopsis angusticollis*; G - *Dinenympha gracilis* z *Reticulitermes lucifugus*; H - *Pyrsonympha vertens* z *Reticulitermes flavipes*; I - *Pyrsonympha* sp. z *Reticulitermes lucifugus*; K - *Dinenympha fimbriata* z *Reticulitermes lucifugus*; L - *Dinenympha* sp. z *Reticulitermes lucifugus*; M - *Saccinobaculus ambloaxostylus* z *Cryptocercus punctulatus*;

*N* - *Saccinobaculus ambloaxostylus* z *Cryptocercus punctulatus* (detail jaderné oblasti);  
*O* - *Oxymonas* sp. z *Cryptocercus punctulatus*; měřítko odpovídá 10  $\mu$ m. Autory snímků jsou Guy Brugerolle, Kevin Carpenter a Vladimír Hampl (Převzato z dosud nepublikované kapitoly, Hampl V. Class Oxymonadea, Handbook of Protoctista, II. Edition.)

Oxymonády představují největší z několika skupin anaerobů, u nichž nebyla dosud dostatečně prokázána mitochondrie nebo její homolog. Absencí mitochondrie a Golgiho aparátu byly oxymonády vedeny jako jedna z původních skupin eukaryot tzv. Archezoa (Cavalier-Smith 1981, 1998). U druhu *Saccinobaculus doraxostylus* byly popsány denzní organely ohraničené dvojitou membránou (Carpenter a kol., 2008). Ultrastrukturální studie odhalily, že *Trimastix*, blízký příbuzný oxymonád, sice také postrádá klasické mitochondrie, ale vlastní organely podobající se hydrogenosomům ohraničené dvojitou membránou (O'Kelly, 1993; Brugerolle a Patterson, 1997; Simpson, Bernard a Patterson, 2000). Mnoho autorů tvrdilo, že jsou to v nějaké formě modifikované mitochondrie (Brugerolle a Patterson, 1997). Toto tvrzení bylo podpořeno ultrastrukturálními důkazy naznačující blízký vztah mezi rodem *Trimastix* a exkavátními taxony vlastníci mitochondrie, jako je například *Malawimonas* (O'Kelly, Farmer a Nerad, 1999; Simpson, Bernard a Patterson, 2000) a konečně také studií transkriptomu, která našla u *Trimastix pyriformis* množství transkriptů pro mitochondriální proteiny (Hampl a kol. 2008). Nalezením mitochondriálního homologu u rodu *Timastix* se také potvrdilo, že oxymonády jsou druhotně amitochondriální (Dacks a kol., 2001).

Oxymonády se rozmnožují binárním dělením a mají mitózu uzavřeného typu (nedochází k porušení jaderné membrány tzv. kryptomitóza) s intranukleárním vřeténkem. Během dělení dochází k depolymerizaci parentálního axostylu (Cleveland, 1938, Hollande a Carruette-Valentin, 1970b). Pro čeleď Oxymonadidae je charakteristická migrace jader napříč buňkou. Pohlavní rozmnožování zahrnující gametogenezi, oplodnění a meiózu je známo u oxymonád *Notila*, *Saccinobaculus* a *Paranotila* vyskytujících se u dřevokazného švába *Cryptocercus* (Cleveland, 1950b, c; Cleveland, 1966). Synaptonemální komplexy charakteristické pro meiózu byly zaznamenány u *Pyronympha flagellata* (Hollande a Carruette-Valentin 1970a). Vývojové i pohlavní cykly prvoků jsou řízeny svlékajícím hormonem ekdyzonem produkovaným hostitelem, což má za následek synchronizaci mezi svlékáním hostitele a cykly prvoků (Grassé 1952; Cleveland, 1956; Cleveland a kol., 1960). Bylo prokázáno, že termity během svého nymfálního svlékání

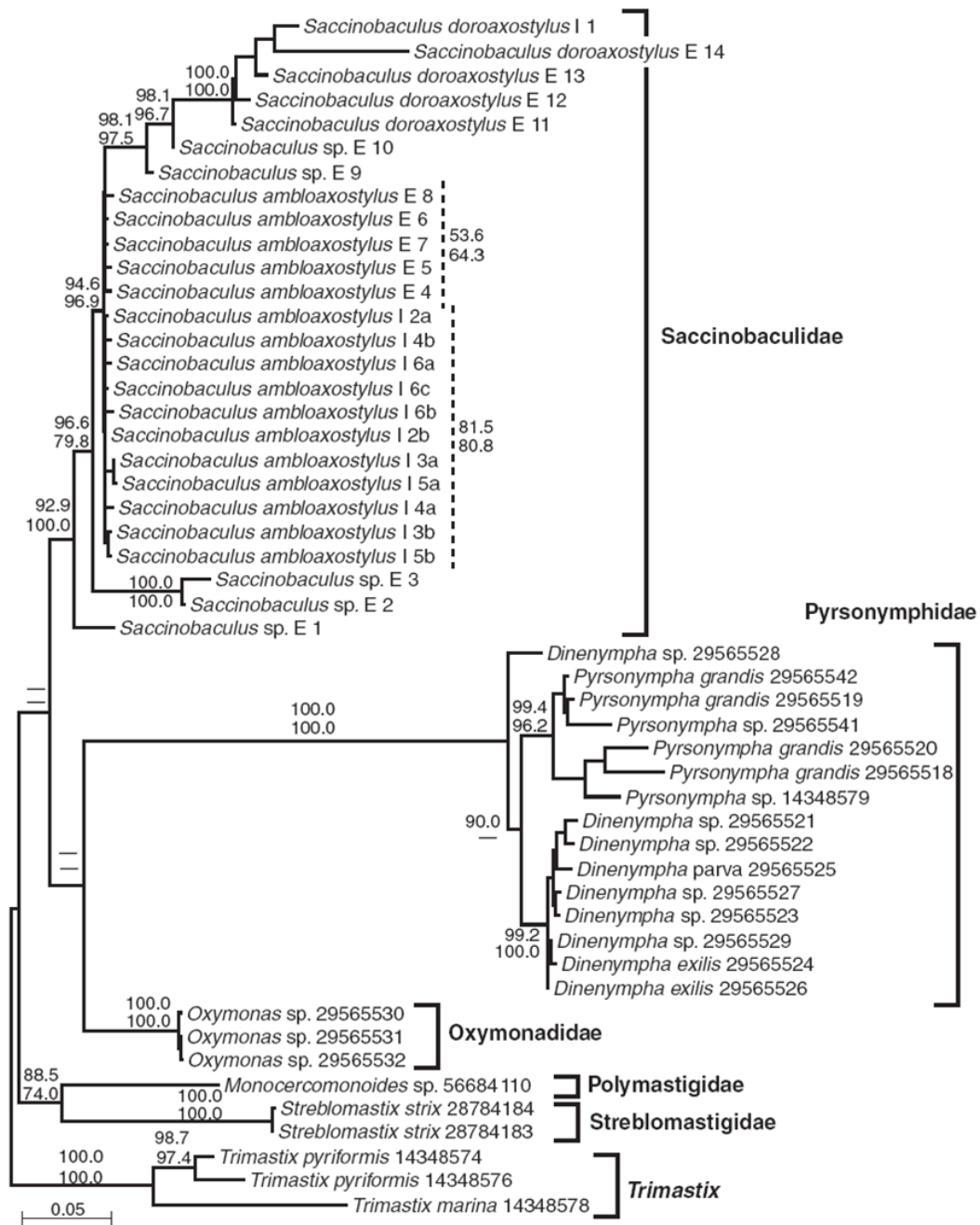
ztrácí veškeré střevní prvoky. Jak už bylo zmíněno, jsou tyto prvoci pro své hostitele životně důležití, a proto dochází k reinfekci termitích hostitelů požitím výkalů dospělců (Brugerolle a Radek, 2006). U rodů *Monocercomonoides*, *Saccinobaculus* a *Sauromonas* byla prokázána tvorba cyst (Cleveland 1950a; Grassé 1952).

## 5.2 Taxonomické zařazení a morfologie oxymonád

Taxonomická pozice oxymonád byla značnou dobu nejistá a tuto nejistotu nezměnily ani analýzy prvních genových sekvencí (EF1 $\alpha$  a  $\alpha$ -tubulinů) (Dacks a Roger, 1999; Moriya a kol., 1998, 2001). Pozdější analýzy genu pro SSU rRNA (Dacks a kol., 2001) doplněné o další sekvenční data (Keeling a Leander, 2003; Moriya a kol., 2003; Stingl a Brune, 2003) naznačují silně podpořený příbuzenský vztah mezi oxymonádami a volně žijícími prvoky rodu *Trimastix*. Dohromady tedy oxymonády s trimastixem tvoří skupinu Preaxostyla. Morfologickou synapomorfii skupiny Preaxostyla je vzhled I fibrily u *Trimastix* a jejím homologem u oxymonád, kde je I fibrila parakrystaliní součástí preaxostylu (Simpson, 2003). Na základě typických exkavátních znaků pozorovaných u rodu *Trimastix* a molekulárních studií fylogenetické příbuznosti trimastixe k oxymonádám byly tyto organismy zařazeny do říše Excavata (Cavalier-Smith, 2002; Simpson a kol., 2006). Někteří autoři klasifikují Preaxostyla v rámci exkavát do kmene Metamonada společně s dalšími anaerobními nebo mikroaerofilními skupinami, fornikáty a parabasalidy (Cavalier-Smith, 1998, 2003; Corliss, 1994).

Vztahy uvnitř skupiny Oxymonadida nejsou dobře prozkoumány, ale všechny nedávné analýzy (Obr.2) se do značné míry shodují na sesterském postavení rodu *Monocercomonoides* a *Streblomastix* (Hampl a kol., 2005; Heiss a Keeling, 2006; de Koning a kol., 2008).

Zástupci jsou klasifikováni do pěti čeledí – Polymastigidae, Streblomastigidae, Saccinobaculidae, Oxymonadidae a Pyrsonymphidae (Grassé, 1952; Vickerman, 1982; Brugerolle a Lee, 2002) (Obr. 2). V následujícím textu jednotlivé čeledi v krátkosti představím.



Obr.2. *Fylogenetický strom genu pro SSU rRNA oxymonád zakořeněný rodem Trimastix. Délky větví byly získány metodou Maximum likelihood a hodnoty na uzlech představují maximul likelihood bootstrapy a Bayeské posteriorní pravděpodobnosti (Keeling a Heiss, 2006).*

### 5.2.1 Čeleď Polymastigidae

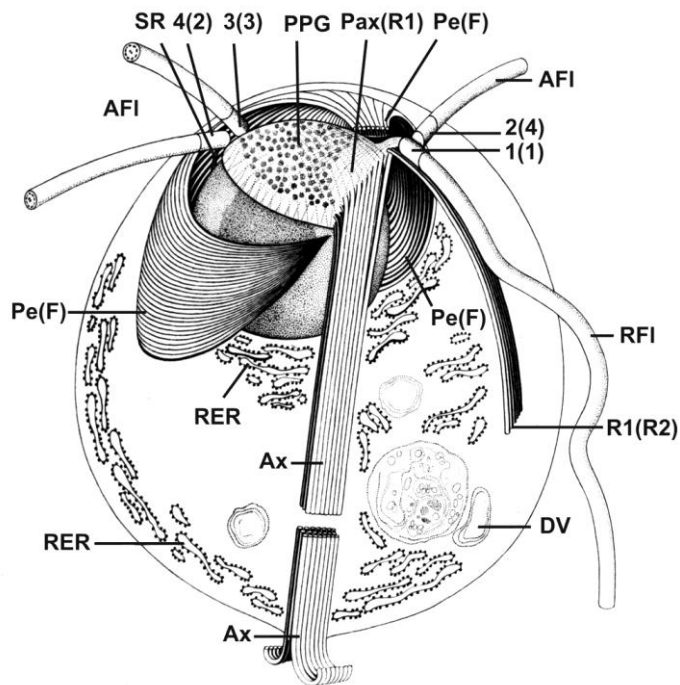
Do této čeledi jsou řazeny tři rody malých bičíkovců *Monocercomonoides*, *Polymastix* a *Paranotila*. Buňky těchto oxymonád jsou vybaveny čtyřmi bičíky, z nichž jeden je zpětný a tenkým nektraktilním axostylem. Jádro je uloženo anteriorně.

*Monocercomonoides* (Travis, 1932)

V současné době je známo více než 30 druhů (uvedeny v nepublikované kapitole, Hampl V. Class Oxymonadea, Handbook of Protozoology, II. Edition), ale identita některých z nich není zcela jistá. Přibližně polovina druhů obývá zadní část střeva „hindgut“ imág xylofágního hmyzu (švábů *Cryptocercus*, *Parasphaeria*, nižších termitů) (Cleveland a kol., 1934) a larev hmyzu (*Tipula* nebo *coleoptera Lygirodes*, *Cetonia*) (Travis, 1932). Druhou polovinu zástupců této skupiny bychom našli v zažívacím traktu obratlovců (hlodavců, přežvýkavců, plazů a obojživelníků) (Kirby a Honigberg, 1949; Nie, 1950; Moskowicz, 1951; Kulda a Nohýnková, 1978).

Malé oválné nebo hruškovité buňky (délka 5 – 15  $\mu\text{m}$ ) (*Obr. 1. A – C*) nesou čtyři dlouhé bičíky uspořádané do dvou párů oddělených preaxostylární laminou, tzv. preaxostyl. Tato struktura se skládá ze dvou vrstev, první je tvořena jednou řadou mikrotubulů lemujících jádro, druhá obsahuje nemikrotubulární materiál. V preaxostylární oblasti jsou četná polysacharidová granula. Celým tělem monocerkomonoidů prochází výrazná buněčná osa – axostyl, vybíhající na konci buňky ven. Axostyl se skládá ze tří rovnoběžných řad mikrotubulů navzájem propojených spojovacími můstky. Řada mikrotubulů z preaxostylu se v oblasti jádra přikládá k axostylu a pokračuje dále do zadní části buňky. Mikrotubulární kořen R1 u rodu *Monocercomonoides* nazývaný funis je plně vyvinut. Funis podkládá zpětný bičík, který adhezuje k povrchu buňky. Bazální tělíčko umístěné nejvíce vpředu (*č. 4 na Obr. 3*) je zde spojeno s mikrotubulárním kořenem R2. Tento kořen tvoří základ mikrotubulárního listu pelty, která ze shora chrání jádro (Brugerolle a Joyon, 1973; Kulda a Nohýnková, 1978; Radek, 1994; Simpson a kol., 2002a; Brugerolle a kol., 2003). Simpson a kol. (2002a) navrhl homologizovat cytoskeletální znaky oxymonád a typických exkavát. Tato exkavátní terminologie cytoskeletálních struktur je uvedena na obrázku 3 v závorkách.





Obr.3. Ultrastruktura rodu *Monocercomonoides*: Terminologie podle Radek (1994), terminologie podle Simpson a kol., (2002a) je uvedena v závorkách. 1, 2, 3, 4 – bazální tělíska 1-4; AFI – přední bičík; Ax – axostyl; DV – trávicí vakuola; F – vějíř; Pax – preaxostyl; Pe – pelta; PPG – perinukleární polysacharidová granula; R1 – mikrotubulární kořen R1; R2 - mikrotubulární kořen R2; RFI – zpětný bičík; RER – hrubé endoplasmatické retikulum; SR – proužkovaný kořen. Autor obrázku dr. Eva Nohýnková (převzato z dosud nepublikované kapitoly, Hampl V. *Class Oxymonadea, Handbook of Protozoology, II. Edition*).

#### *Polymastix* (Bütschli, 1884)

Rody *Polymastix* a *Monocercomonoides* byly od sebe rozlišeny na základě morfologie buněk barvených protargolem a železitým hematoxylinem (Grassé, 1952; Brugerolle a Lee, 2000a). Elektronová mikroskopie potvrdila a rozšířila znalosti základních znaků oxymonád (Brugerolle a Joyon, 1973; Brugerolle, 1981; Brugerolle a kol., 2003). Od rodu *Monocercomonoides* se zástupci tohoto rodu liší v několika znacích. Tvar těla těchto bičíkovic je mandlovitý nebo vřetenovitý (dlouhý asi 10  $\mu\text{m}$ ), nejnápadnější je však přítomnost symbiotických bakterií *Fusiformis* na povrchu buňky. Čtyři přední bičíky jsou uspořádané do dvou oddělených párů, zpětný bičík je však podložen jen krátkou fibrilou R1 (funisem) a neadheruje k povrchu buňky. Dále má úzký preaxostyl, štíhlý axostyl složený z deseti řad mikrotubulů nevyčnívající na konci buňky. Jádro je anteriorně zašpičatělé se zadním endosomem, kryté drobnou peltou. Nalezneme zde však také

společný znak mezi rody *Monocercomonoides* a *Polymastix*, kterým je mikrofibrilární svazek spojující jádro s prvním párem bazálních tělísek. V současné době je uznáváno 6 druhů a dodnes nepopsaný zřejmě nový druh byl zaznamenán u švába *Parasphaeria* (Brugerolle a kol., 2003). *Polymastix* (Obr.1. D, E) byl popsán ze zadního střeva larev tiplic (Mackinnon, 1913), brouků a také z mnohonožek *Glomeris* a *Rhizocrinus* (Grassé, 1926, 1952).

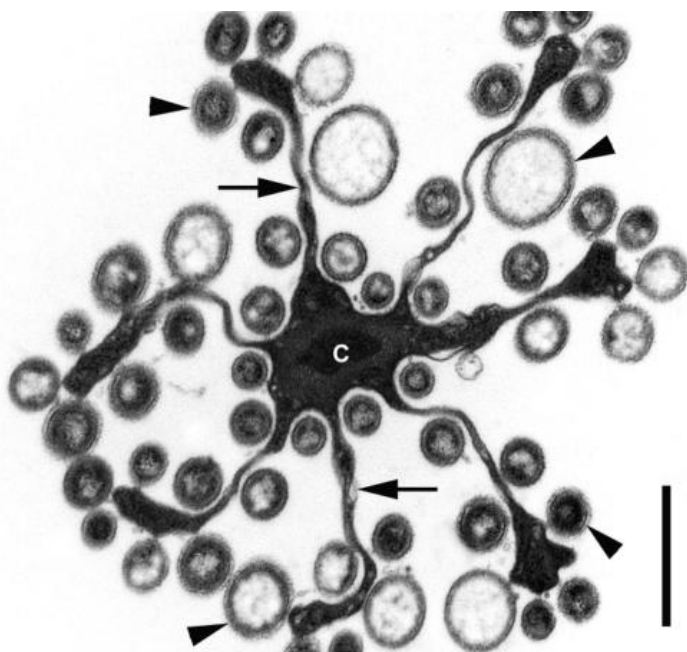
*Paranotila* (Cleveland, 1966)

Jednojaderná buňka (15 – 25  $\mu\text{m}$ ) je delší než u rodu *Monocercomonoides*, nese čtyři laterálně umístěné přední bičíky, které jsou jen lehce adherované k povrchu buňky. Jednoduchý axostyl není kontraktilní a na konci těla nevybíhá ven. U rodu *Paranotila* byl popsán pohlavní cyklus, který zahrnuje automixii a je řízen hostitelským svlékajícím hormonem ekdysonem. Buňky projdou gametogenezí, kde dojde k vytvoření osmi samčích a osmi samičích gametických jader, která posléze splynou a vytvoří osmi jadernou zygotu, která se pozvolna rozpadá na osm diploidních buněk. Doposud byl popsán pouze jediný druh *P. lata* z *Cryptocercus punctulatu* (Cleveland, 1966). Na základě morfologických znaků byla *Paranotila* klasifikována mezi polymastigidy (viz Brugerolle a Lee, 2000).

### 5.2.2 Čeleď Streblomastigidae

Tato čeleď obsahuje pouze jediný rod s jediným popsáním druhem, *Streblomastix strix* (Kofoid a Swezy, 1919), který obývá zadní střevo termitů z čeledi *Termopsidae*, například *Zootermopsis angusticollis* (Obr.1. F, J). Poměrně rigidní buňky vřetenovitého tvaru jsou obvykle dlouhé 20 – 50  $\mu\text{m}$ , ale známe i zástupce dlouhé přes 530  $\mu\text{m}$ . Jedinci této délky připomínají bič a byli pozorováni v hladovějících termitech (Kidder, 1929; Kofoid a Swezy, 1919). Čtyři bičíky jsou uloženy subapikálně a neadherují k povrchu buňky. Na předním konci je vytvořeno tenké rostellum. Tato struktura je kontraktilní a slouží k přichycení ke střevnímu epitelu. U mladých jedinců je rostellum malé nebo zcela chybí (Kidder, 1929; Brugerolle a Lee, 2000). Na povrchu buňky najdeme mnoho symbiotických tyčinkovitých bakterií. Povrch bičíkovce není hladký, jsou na něm patrné spirálně se točící záhyby, které se vinou od předního konce k zadnímu. Tato struktura se nejspíše vyvinula pro vytvoření co největší kontaktní plochy k přisednutí symbionta. Přidáním antibiotik symbionti odpadnou a buňka se změnila do tvaru slzy (Dexter-Dyer a Khalsa, 1993; Leander a Keeling, 2004). Na příčném řezu buňkou rodu *Streblomastix* můžeme vidět hvězdicovitě

strukturovanou redukovanou cytoplasmu zhušťující se směrem do středu, ze které vychází 6 – 7 tenkých listů denzní hmoty stáječících se zleva doprava (*Obr.4*) (Leander a Keeling, 2004). Jádro má tvar husté tenké spirály. Mikrotubulární cytoskelet se skládá z axostylu, pely a preaxostylu. Preaxostylární lamina propojuje dva páry bazálních tělísek. V přední části buňky nad jádrem jsou mikrotubuly axostylu uspořádány do několika paralelních řad (syn. “rhizoplast“ u Kidder (1929)), zatímco v oblasti kolem jádra tvoří mikrotubuly pouze jednu řadu, která obklopuje jádro. V zadní části přechází axostyl do formy volného svazku mikrotubulů, tato kontraktilní struktura slouží k pohybu buňky. Pelta spirálovitě obklopuje axostyl v oblasti před jádrem, zároveň chrání přední část jádra. Buňka se dělí binárním dělením a buněčný cyklus je pravděpodobně ovlivněn cyklem svlékání termitů. Nebyla u nich pozorována encystace. Morfologii studoval Kofoid a Swezy (1919), Kidder (1929), Grassé (1952), elektronovou mikroskopií se zabýval Hollande a Carruette-Valentin (1970b), Leander a Keeling (2004).



*Obr.4. TEM příčný řez ukazující hvězdicovitou morfologii hostitelské buňky Streblomastix strix. Písmenem c je označen střed zhušťující se cytoplasmu, z které vybíhá 7 tenkých listů denzní hmoty (Leander a Keeling, 2004). Měřítko odpovídá 1 $\mu$ m.*

### 5.2.3 Čeleď Saccinobaculidae

Zástupci z této čeledi patří mezi nejzajímavější oxymonády, pokud jde o jejich chování a způsob pohybu. Cleveland a kol. (1934) popsal původně tři druhy rodu *Saccinobaculus*

(Obr.1. M, N) ze zadního střeva dřevokazného švába *Cryptocercus punctuatus*, který je stále jediným známým hostitelem těchto prvků. Každý bičíkovec nese čtyři, osm nebo dvanáct neadherovaných nebo částečně adherovaných bičíků), ale dle pozorování přispívají tyto struktury k celkovému pohybu jen velmi malou měrou. Pohyb těchto jedinců je založen na kontraktilitě axostylu – svazek mikrotubulů probíhající celou buňkou, který se vlní v proměnlivých intervalech a různé frekvenci. Vlny se sinusoidou šíří od předního konce k zadnímu (McIntosh a kol., 1973; McIntosh, 1973). Tyto pohyby jsou často rychlé a stejně rychle působí také drastické změny ve tvaru buňky (viz Heiss a Keeling, 2006). Takový styl pohybu přirovnal Cleveland k hadovi vrtícímu se v pytli, odtud bylo také odvozeno jejich jméno (Cleveland a kol., 1934). Bičíkovci této čeledi nemají žádné přichycovací struktury. Dále u nich bylo zjištěno pohlavní rozmnožování (Brugerolle a Lee, 2000). Fylogenetická pozice těchto oxymonád bylo určena pomocí molekulárních dat (Heiss a Keeling, 2006). Do čeledi Saccinobaculidae jsou řazeny dva morfologicky velmi podobné rody.

#### *Saccinobaculus* (Cleveland, 1934)

Hruškovitá buňka ke konci se zužující (15- 170  $\mu\text{m}$ ), jejímž základem je mastigont skládající se ze dvou párů bičíků spojených preaxostylem. Při zmnožení bičíků dochází rovněž ke zmnožení preaxostylů. Axostyl prochází mezi dvěma amorfními elektron-denzními oblastmi. Mikrotubuly preaxostylu i nadále tvoří první řadu axostylárních mikrotubulů odcházející od jádra. V oblasti před jádrem se k axostylu připojují podobné, ale kratší mikrotubuly, takže axostyl ve své nejširší části obsahuje více než 8000 mikrotubulů. Axostyl tvořící nad jádrem oblouk, dále pokračuje směrem dozadu, kde se stáčí do srpu, který kruhovitě nebo spirálovitě téměř uzavírá distální konec buňky, odkud vybíhá ven. Počet mikrotubulů se ke konci buňky výrazně snižuje. Jádro je pevně spojeno s dorzální stranou axostylu. Pelta kryje přední část těla (McIntosh a kol., 1973). V cytoplazmě *Saccinobaculus doroaxostylus* byly nalezeny nápadné elektron-denzní granule (McIntosh a kol., 1973; Carpenter a kol., 2007), které mohou představovat peroxisomy nebo modifikované mitochondrie (Carpenter a kol., 2007). Na povrch buněk jsou přítomny kruhové struktury s póry (Carpenter a kol., 2007) podobné těm nalezeným u nepopsaných pyronymph (Maass a Radek, 2006). Jejich funkce nebyla dosud objasněna, ale mohla by mít souvislost s endocytózou. Přítomnost epibiotických bakterií není častá. Přenos bičíkoveců z hostitele na hostitele je uskutečňován formou cyst (Cleveland a kol., 1934). Sexuální cyklus zahrnuje gametogenezi, oplodnění a meiózu a závisí opět na

svlékání hostitele (Cleveland, 1950a). V současné době jsou známy čtyři druhy lišící se od sebe velikostí, granulemi v axostylu nebo cytoplazmě (Cleveland a kol., 1934; Heiss a Keeling, 2006). Cleveland (1950b) přemístil *S. doroaxostylus* spolu se *S. minor* do rodu *Oxymonas* jako *O. doroaxostylus* a *O. nana*. Molekulárně fylogenetické studie provedené Heissem a kol. (2006) vedly k závěru, že tyto druhy by měly být řazeny do rodu *Saccinobaculus*.

*Notila* (Cleveland, 1950)

Zástupci tohoto rodu si jsou velice podobní s oxymonádami rodu *Saccinobaculus*. K jejich oddělení došlo na základě rozdílů v jejich pohlavních cyklech (Cleveland, 1950c). Hlavním rozdílem je, že jak trofozoiti, tak “gamety“ *Notila* jsou diploidní. Haploidní fáze se vyskytuje pouze u gametického jádra, které projde meiózou až po splynutí gametických buněk. Morfologicky se od rodu *Saccinobaculus* liší axostylem, který nevybíhá z buňky, nemá terminální obal a neobsahuje granula. Jedinci rodu *Notila* žijí volně ve střevním obsahu švába *Cryptocercus punctuatus* (Grassé, 1952).

#### 5.2.4 Čeleď Oxymonadidae

Oxymonády patřící do této čeledi obývají střevní trakt termitů čeledi Kalotermitidae, kde se vyskytují buď ve formě volně pohyblivých bičíkovců nebo jako přisedlé formy přichycené k chytinózní stěně střeva pomocí mikrofibrilárního “holdfast“ umístěného na samém vrcholu rostella (Cross, 1946). Rostellum může být v některých případech několika násobně delší než samotná buňka (*Obr.1. O*), také je schopné se prodlužovat a zkracovat. Silný kontraktilní axostyl probíhá celou buňkou až do rosttela. Na rozdíl od rodu *Saccinobaculus* není pohyb buněk pravděpodobně obstaráván pouze axostylem, ale podílejí se na něm i bičíky. Buňky těchto bičíkovců jsou jednojaderné nebo vícejaderné. Během mitózy dochází k migraci jádra vpřed a v telofázi se vrací zase zpět. Buněčný povrch je hustě pokryt epibiotickými tyčinkovitými bakteriemi a spirochetami (Cleveland, 1950c; Brugerolle a König, 1997; Rother a kol., 1999).

*Oxymonas* (Janicki, 1915)

Buňky kyjovitého tvaru (5 – 240  $\mu\text{m}$ ) obsahují obvykle jedno jádro, čtyři bičíky vycházející ze dvou párů bazálních tělísek (Cross, 1946). Na špičce rostella vzniká paraxostyl složený z mikrotubulů organizovaných do složitě zvlákněných listů, který

společně se svazkem volných mikrotubulů podpírá rostellum. Volné mikrotubuly začínají na různých místech rostella a plynule přechází do axostylu. Silný axostyl se skládá ze souběžných řad tisíců mikrotubulů, které jsou mezi sebou propojené můstky. Preaxostylární lamina spojuje dva páry bazálních tělísek s axostylem. Povrch buněk rodu *Oxymonas* je pod vrstvou epibiotických bakterií zcela pokryt extracelulárními povrchovými strukturami, které mají tvar včelí plástve. Tyto struktury jsou základním znakem termitích bičíkovců, do těchto míst se právě připojují epibiotické bakterie (Bruggerolle a König, 1997; Rother a kol., 1999). Doposud bylo popsáno 26 druhů.

*Microrhopalodina* (syn. *Proboscidiella*, *Opisthomitus*) (Grassi a Foa, 1950)

Zástupci rodu *Microrhopalodina* (23 – 165  $\mu\text{m}$ ) vlastní různý počet karyomastigontů (4 – 50) obvykle se však vyskytují buňky se čtyřmi, osmi nebo dvanácti karyomastigonty uspořádanými do límce u báze rostella. V přední části těla ztratily mikrotubuly axostylů pravidelné uspořádání a tvoří dohromady jediný volný svazek, který v této podobě prochází, jak rostellem, tak celou buňkou (Cross, 1946). Podobně jako u rodu *Oxymonas* rostellum obsahuje volné mikrotubuly a buňky rodu *Microrhopalodina* jsou zcela pokryty extracelulárními povrchovými strukturami s asociovanými bakteriemi (Rother a kol., 1999). Tento rod zahrnuje 4 popsané druhy.

*Barroella* (syn. *Kirbyella*) (Zeliff, 1944)

Kyjovité buňky (27 – 224  $\mu\text{m}$ ) bez bičíků obsahující více jader (2 – 114) rozptýlených v cytoplasmě byly opsány do dvou druhů. Počet axostylů většinou neodpovídá množství jader. Tato tenká, složitě stočená struktura je mnohem delší než buňka sama. Nezralé buňky pocházející z pučících větších buněk jsou podobné rodu *Microrhopalodina* s límcem bičíků a krátkými axostyly (Cross, 1946).

*Sauromonas* (Grassé a Hollande, 1952)

Známý je pouze jediný druh *S. m'baikiensis*, který je symbiontem *Glyptotermes boukoko* (Grassé, 1952). V přisedlé formě obsahuje jedno jádro, čtyři bičíky a jeden velký axostyl vyčnívající ven, stejně jako rod *Oxymonas*. Rostellum obsahuje zpětný fibrilární svazek. Při svlékání termitů dochází k odpojení organismů od střevní stěny. Oxymonády prochází sérií změn, jejichž výsledkem je mnohobičíkatá buňka, která postupně ztrácí bičíky a encystuje se (Grassé, 1952).

### 5.2.5 Čeleď Pyrsonymphidae

Endosymbiotické oxymonády žijící pouze v zadním střevě dřevokazných švábů a termitů, především rodu *Reticulitermes*. Poprvé tyto bičíkovce pozoroval Leidy (1877), který je také jako první i pojmenoval. Studium pyrsonymph se zabýval Cleveland (1938), Grassé (1952, 1956). Výzkum zaměřený na ultrastrukturu, zároveň také na jejich episymbionty a endosymbionty provedl Bloodgood a kol. (1974) a Smith a Arnott (1974). Byl sestaven katalog obsahující 68 druhů těchto oxymnád společně s jejich hostiteli (1979).

Zástupci této čeledi mají čtyři nebo osm bičíků uspořádaných do dvou nebo čtyř oddělených párů propojených preaxostylem. Bičíky jsou uloženy v rýhách na povrchu buňky a vinou se podél celého těla v levotočivých spirálách až na konce buňky, kde pokračují volně (Kirby, 1932; Bloodgood a kol., 1974). K pohybu jim slouží především kontraktilní axostyl, který vede napříč celou buňkou a skládá se z tisíců (2000 – 4000) paralelně uspořádaných mikrotubulů navzájem propojených můstky. Vlny se šíří zpředu dozadu rychlostí 100  $\mu\text{m/s}$  (Langford a Inoue, 1979). Většina druhů pyrsonymph obsahuje endobiotické bakterie v cytosolu a epibiotické bakterie na povrchu. Bakterie mohou pokrývat celý povrch těla (*Dinenympha fimbriata*) nebo pouze zadní část (*Pyrsonympha*). Prokaryoti jsou k povrchu oxymonád přichyceni pomocí struktur vzniklých koevolucí mezi prvky a bakteriemi (Smith a Arnott, 1974; Bloodgood a kol., 1974).

Taxonomie této čeledi byla v minulosti velice sporná, na tuto problematiku převládaly dva názory. Řada autorů (Grassé, 1952; Koidzumi, 1921; Smith a kol., 1975; Yamin, 1979) zastávala názor, že *Pyrsonympha* a *Dinenympha* tvoří samostatné rody (nebo podrody v případě Koidzumi, 1921) v rámci čeledi Pyrsonymphidae. Jiný názor tvrdil, že *Dinenympha* je jen jiným stupněm životního cyklu *Pyrsonympha*. Toto tvrzení bylo založeno na morfologické podobnosti rodů, dále na mikroskopickém pozorování a obsahu DNA (Dubosq a Grassé, 1952; Hollande a Carruette-Valentin, 1970a; Leidy, 1881). Tento spor vyřešily molekulární studie, které potvrdily samostatnost rodů *Pyrsonympha* a *Dinenympha* (Moriya a kol., 2003; Stingl a Brune, 2003). V současné době jsou tedy uznávány dva rody.

*Pyrsonympha* (Leidy, 1877)

Hruškovité buňky (20 – 150  $\mu\text{m}$ ) (Obr.1. H, I) těchto zástupců mají v zadní části těla mnoho fagocytovaných váčků obsahující drobné částičky dřeva. Tyto oxymonády mají na předním vrcholu buňky vyvinutou přichycovací mikrofibrilární strukturu pro upevnění

jedince ke střevní stěně hostitele – “holdfast“ (Cochrane a kol., 1979). Jedinci rodu *Pyrsonympha* jsou vybaveni osmi bičíky a souběžně dvěma preaxostylárními fibrilami (Bloodgood a kol., 1974). Toto uspořádání pravděpodobně představuje prodlouženou fázi životního cyklu předcházející buněčnému dělení. U druhu *Pyrsonympha vertens* se preaxostyl skládá z volného svazku mikrotubulů a vybíhá paralelně s axostylem z oblasti bazálních tělísek (Bruggerolle, 1970). Pelta je u těchto prvoků redukována pouze na několik mikrotubulů (= solénolomme označované u Holland and Carruette-Valentin (1970b)). Povrch je u rodu *Pyrsonympha* pokryt drobnými plátky neznámé funkce a povahy (Smith a Arnott, 1973). Stejně jako u *Saccinobaculus* byly nalezeny kruhové struktury (Maass a Radek, 2006). Dosud bylo popsáno 10 druhů.

#### *Dinenympha* (Leidy, 1877)

Tento rod zahrnuje malé podlouhlé buňky (12 – 30  $\mu\text{m}$ ) šroubovitého tvaru volně se pohybující ve střevní tekutině (*Obr.1. G-L*). Buňky nesou 4 bičíky, pokud na jejich povrchu nejsou přítomny epibiotické bakterie (např. *D. agilis*) pohybují se charakteristickým vrtivým pohybem (Moriya a kol., 2003; Stingl a Brune, 2003). Dosud bylo popsáno 10 druhů.

### 5.3 Evoluce genetického kódu

Genetický kód hraje klíčovou roli v buněčném životě, a proto je jedním z nejsilnější konzervovaných znaků živých organismů. Téměř všechny genetické systémy včetně bakterií, archebakterií, eukaryot, organel i virů, používající stejný genetický kód nazývaný univerzální (kanonický) genetický kód. Kód však není univerzální zcela, u malého počtu genomů se totiž vyvinuly drobné odlišnosti od standardního kódu a tento nekanonický kód je vodítkem pro pochopení selektivních tlaků udržující genetický kód.

Mitochondriální genomy změnil svůj kód častěji než jakýkoli jiný druh genomu (Yokobori a kol., 2001). Změny ve standardním kódu se vyvinuly také u bakterií rodu *Mycoplasma* (Yamao a kol., 1985) a několika jaderných linií (Knight a kol., 2001). U čtyř eukaryotických jaderných linií byly v jejich genomu zaznamenány zajímavé změny. Jedna unikátní varianta se vyskytuje u několika druhů kvasinky *Candida cylindrica*, kde kodon CTG kóduje častěji aminokyselinu serin místo leucinu (Kawaguchi a kol., 1989). U nálevníků se vyvinuly nejméně tři nekanonické genetické kódy, kodon TGA u zástupců rodu *Eplotes octocarinatus* nezastává funkci stop kodonu, ale spíše kóduje aminokyselinu



cystein (Meyer a kol., 1991). Kodon TGA kóduje u druhů *Blepharisma americanum* a *Colpoda inflata* aminokyselinu tryptofan (Lozupone a kol., 2001). Kodony TAA a TAG u většiny ostatních nálevníků se vyskytují spíše v pozici pro kódování glutamin než jako stop kodony (Caron a Meyer, 1985; Helftenbein, 1985; Horowitz a Gorovsky, 1985). Tento kód se vyvinul u nálevníků vícekrát, ale přesný počet není dosud znám (Lozupone a kol., 2001). Dále bychom ho našli u diplomonád rodu *Hexamita* (Keeling a Doolittle, 1996, 1997), u zelených řas *Dasycladaceae* (Schneider a kol., 1989) a nejnověji také u zástupce oxymonád *Streblomastix strix* (Leander a Keeling, 2003).

Byly navrženy dva modely vysvětlující, jak k těm to změnám mohlo dojít. První “codon-capture“ model je založen na posunech frekvence různých kodonů obvykle v důsledku ovlivnění množstvím AT v genomu, což vede ke ztrátě některého kodonů. Následkem této ztráty translační mechanismy zodpovědné za rozpoznávání tohoto kodonu se ztratí také nebo jsou pozměněny a tím pádem se stanou nefunkční. Když se tento kodon znovu objeví, může se stát, že jej rozpozná jiná tRNA, a tím dojde ke změně kodonu kódující aminokyselinu (Osawa a Jukes, 1989; Osawa a kol., 1992). Základem pro druhý model “unassigned codon“ je vznik mutantní tRNA, která rozeznává jiný kodon, než jí byl určen. Ten je po nějakou dobu rozpoznáván dvěma tRNA. Nakonec jedna z tRNA případně terminační faktor (rozpoznávající stop kodony) zaniknou. Pokud zanikne původní tRNA, funkce rozpoznávání určitého kodonu přejde pod novou tRNA. (Schultz a kol., 1994; Schultz a Yarus, 1996).

### 5.3.1 Nekanonický genetický kód u oxymonád

Nekanonický genetický kód byl pozorován u oxymonády *Streblomastix strix*, kde kanonické stop kodony TAA a TAG kódují aminokyselinu glutamin. Tyto kodony jsou udržovány v mRNA *S. strix* a bylo zjištěno, že legitimním terminálním kodonem všech genů je TGA (Keeling a Leander, 2003; Slamovits a Keeling, 2006b). Studie provedená Keelingem a Leanderem (2003) potvrdila, že alternativní kód u *S. strix* se vyvinul nezávisle na ostatních. Nezávislý původ každého kodu je obzvláště zajímavý, protože stejná odchylka od kanonického kódu, které se vyskytuje u *S. strix* se vyvinula také u některých ostatních jaderných linií obsahujících alternativní kód, ale nikdy nebyla prokázán u prokaryot (Keeling a Doolittle, 1996).

Přítomnost nekanonického genetického kódu byla zkoumána také u dalších oxymonád. Jednou ze zkoumaných skupin byl i rod *Monocercomonoides*, z jehož kmene

PA203 bylo osekvenováno osm protein-kódujících genů. Výsledky této studie nepotvrdily používání nekanonického kódu pro aminokyselinu glutamin (Hampl a kol., 2005). Dále máme k dispozici je úlokovité informace. Známý jsou údaje genu pro elongační faktor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) z nedefinovaných zástupců oxymonád (Moriya a kol., 1998), data získaná z dvou blízkých rodů *Pyronympha* a *Dinenympha* pro geny EF-1 $\alpha$  a  $\alpha$ -tubulin (Moriya a kol., 2001). Útržkovité údaje získané z těchto genů ale neposkytují dostatečný důkaz pro potvrzení přítomnosti nekanonického genetického kódu u těchto jedinců. Na základě těchto údajů se musel genetický kód změnit v určitém okamžiku v rámci linií oxymonád (de Koning a kol., 2008).

V nedávné studii byly získány 3 environmentální sekvence ze střeva švába *Cryptocercus punctulatus*, u kterých byla zjištěna přítomnost TAR kodonů v pozicích pro glutamin. Tyto sekvence byly přiřazeny k zástupcům rodu *Monocercomonoides*. Na základě důkazů o používání nekanonického kódu a znalosti příbuzenských vztahů mezi skupinami oxymonád by se měly tyto 3 environmentální sekvence na fylogenetickém stromě vyskytovat v blízkosti rodu *Streblomastix*, což však nebylo prokázáno. Byla formulována hypotéza navrhuující, že čeleď Polymastigidae je parafyletická, a tudíž rod *Streblomastix* se vyvinul v rámci této linie. Dle této hypotézy tedy někteří zástupci této čeledi používají univerzální genetický kód jako kmen PA203 a jiní spolu s rodem *Streblomastix* používají nekanonický genetický kód (de Koning a kol., 2008). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli prozkoumat používání nekanonického kódu u dalších zástupců rodu *Monocercomonoides*.

## 6 MATERIÁL A METODY

### 6.1 Původ zkoumaného materiálu

Materiál pro naši práci byl čerpán z již zavedených kultur oxymonád nebo ze zamražených kultur v tekutém dusíku, které se nám podařilo vymrazit a udržet životaschopné v médiu. Tento zdroj materiálu byl doplněn o vzorky DNA, případně i o hmyzí kultury od Mgr. Pavly Smejkalové. K dispozici jsme tedy měli celkem 32 vzorků DNA oxymonád, z čehož je 11 zástupců stále vedeno v kulturách, které jsou pravidelně každý týden přeočkovávány do dvoufázového média Dobel-Leidlaw (Dobell-Leidlaw, 1926). Vzorky pocházejí ze střevního obsahu různých zástupců živočišné říše.

#### 6.1.1 Složení a příprava kultivačních médií

- Dobell-Leidlaw (1926)

Dvoufázové médium Dobell-Leidlaw se skládá z pevné a tekuté fáze. Obě tyto fáze byly připravovány odděleně a zkompletovány vždy přímo před použitím. Pevnou fázi tvoří 1,5 ml koagulovaného koňského séra, které bylo napipetováno do skleněných a plastových zkumavek. Sérum bylo koagulováno v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 80°C po dobu 1 hodiny, zkumavky byly do sterilizátoru umístěny v nakloněné poloze pod úhlem cca 45°. Po skončení cyklu byly vyndány a v pokojové teplotě nechány do následujícího dne, kdy se cyklus sterilizace opakoval. Tento postup je nutný pro úplnou likvidaci možných kontaminujících mikroorganismů, které mohly první sterilizaci přežít v klidové formě – spor. Zkumavky se sterilní pevnou fází byly skladovány v lednici.

Tekutá fáze média se připravuje smícháním 500 ml Ringerova roztoku a 50 ml sterilně odebraných vaječných bílků. Ringerův roztok se skládá z Roztoku A a B, viz *Tab.1*. Oba roztoky byly namíchány a autoklávovány samostatně, tímto krokem se předešlo vysrážení fosfátů za přítomnosti vápenatých kationtů. Po vychladnutí byly roztoky opatrně sterilně smíchány a uloženy do lednice. Následující den bylo pro definitivní zkompletování tekuté fáze média přidáno 50 ml sterilně odebraných vaječných bílků a vše důkladně promícháno. Médium bylo uchováváno ve skleněné lahvi v lednici.

Tab.1. Složení Ringerova roztoku

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

- SOC médium

Tab.2. Složení SOC média

Bacto-trypton	2 g
Bacto-yeast extract	0,5 g
1M NaCl	1 ml
1M KCl	250 µl
2M Mg <sup>2+</sup> sterilní zásobní roztok	1 ml
2M sterilní glukóza	1 ml

Zásobní roztoky na SOC médium:

- 2M Mg<sup>2+</sup> roztok: 20,33 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O + 24,65 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O do 100 ml vody – sterilizováno filtrací
- 1M NaCl (Mw=58.44): 2,9 g do 50 ml vody
- 1M KCl (Mw=74.5513): 3,7 g do 50 ml vody
- 2M glukóza (Mw=180.16): 9 g do 50 ml vody – sterilizováno filtrací

Do 100 ml kultivační lahve byl přidán Bacto-trypton, Bacto-yeast extract, 1M NaCl, 1M KCl a 97 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován v autoklávu, po vychladnutí k němu byl připipetován sterilní Mg<sup>2+</sup> zásobní roztok a sterilní glukóza. Obsah lahve byl doplněn sterilní destilovanou vodou do 100 ml s výsledným pH 7. Roztok byl sterilně rozplněn do mikrozkuvek po 1ml a skladován při -20°C.

- Tekuté LB Broth médium

Tab.3. *LB Broth médium*

LB Broth (Sigma)	10 g
destilovaná voda	Doplnit do 500 ml

Prášek LB Broth byl rozpuštěn v destilované vodě a poté vykláován. Takto připravené médium se později použilo při klonování (viz kap. 3.5.) jako živné médium pro bakterie.

- Pevné LB Broth médium

Tab.4. *Směs LB Broth a agaru na Petriho misky*

LB Broth (Sigma)	10 g
agar (Oxoid)	6 g
destilovaná voda	Doplnit do 500 ml

Nejprve byl prášek LB Broth rozpuštěn v destilované vodě, poté byl do roztoku přidán bakteriologický agar. Médium se nechalo autoklávat, po mírném ochlazení bylo rozplněno do Petriho misek po 25 ml. Ty se pak použily při klonování (viz kap.3.5.).

### **6.1.2 Kultivace anaerobních prvoků**

Před samotnou kultivací bylo nutné nejprve zkompletovat obě složky média Dobell-Leidlaw, tedy koagulované koňské sérum ve zkumavce jsme překryli 3 ml tekuté fáze a připipetovali jsme sterilní Pasteurovou pipetou cca 1 ml inokula kultury s prvoky. Vše probíhalo ve sterilním boxu. Pomocí světelného mikroskopu jsme vždy zkontrolovali stav kultury. Tento postup byl opakován každý týden. Zbytek materiálu ze staré pasáže mohl být použit pro izolaci DNA, pro zamrazení kultury či k tvorbě trvalých preparátů.

### **6.1.3 Zmražování**

#### Zmražování

Do jedné zkumavky Falcon jsme napipetovali 3,4 ml média s narostlou kulturou, dále jsme připipetovali 0,6 ml 100% glycerolu, směs jsme promíchali a následně rozplnili do kryoampulí po 1 ml. Pro každý vzorek jsme tímto způsobem připravili čtyři 1 ml kryoampule, z čehož jedna sloužila jako kontrolní. Na závěr jsme všechny kryoampule

vložili do mrazicího boxu (Mr. FROSTY™ Cryo 1°C, Freezing container, NALGENE). Druhý den byly ampule přemístěny do kryobanky katedry parazitologie. Pro ověření úspěšnosti jsme po pár dnech odebrali jednu kontrolní kryoampuli uchovanou v tekutém dusíku a přidali jsme její obsah do zkumavky s kultivačním médiem.

V rámci naší práce jsme takto zamrazili tři kultury: BAT1, CHAM1 a POTFIB.

## 6.2 Izolace DNA

Nejprve jsme ze zkumavky s kulturou odebrali 2 ml vzorku do dvou mikrozkušavek a stočili na 15 minut/500G. Ve zkumavce jsme nechali 100 µl supernatantu a resuspendovali jsme sediment. Zbylých 1900 µl supernatantu jsme přepipetovali do jiné zkumavky a znovu stočili, po stočení jsme ponechali 100 µl supernatantu a resuspendovali sediment. Na konec jsme resuspendované sedimenty spojili. Tímto postupem jsme zvýšili koncentraci požadované DNA. Vlastní izolaci jsme provedli pomocí komerčně dodávaného kitu DNeasy® Blood & Tissue Kit (50) (Qiagen) dle přiloženého protokolu „Purification of total DNA from animal blood or cells (spin-column protokol)“ nebo kitu Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) (Geneaid) dle protokolu „Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) Cultured Cell Protocol“. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop® ND-1000).

## 6.3 Amplifikační reakce a elektroforéza

### 6.3.1 Amplifikace DNA

Ze získané DNA byla pomocí metody PCR amplifikována část genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA). Pro amplifikaci genu byly použity tyto polymerázy: LA polymeráza (5U/µl; Top-Bio) viz *Tab.6* a *Tab.7*, Taq DNA polymeráza (5U/µl; Fermentas) viz *Tab.8* a *Tab.9*, EmeraldAmp® MAX PCR „Master Mix“ (TAKARA BIO INC.) viz *Tab.10* a *Tab.12*, Combi PPP „Master Mix“ (Top-Bio) viz *Tab.11* a *Tab.12*.

Dále byly kromě univerzálních eukaryotických primerů (Medlin a kol. 1988) také použity primery specifické pro oxymonády viz *Tab.5*. Před použitím byly všechny primery naředěny na koncentraci 10 pmol/µl. V následujících tabulkách je uvedeno složení směsí

pro amplifikační reakce pro příslušné polymerázy a také nastavení teplotních cyklů termocyclerů.

*Tab.5. Použité primery*

Název	Sekvence 5' → 3'
Medlin A	AYC TGG TTG AYY TGC CAG
Medlin B	TGA TCC ATC TGC AGG TTC ACC T
Monides SSUR	TCA CCT ACG GAA ACC TT
Monides SSUF	GAA GTC ATA TGC TGT CTC AA

*Tab.6. Reakční směs s použitím LA polymerázy (Top-Bio)*

10x LA pufr (+ MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1,5 µl
DMSO	1 µl
Medlin A/ Monides SSUF (10 pmol/µl)	1,25 µl
Medlin B/ Monides SSUR (10 pmol/µl)	1,25 µl
LA polymeráza (5U/µl)	0,5 µl
DNA	5 µl
H <sub>2</sub> O	doplnit do 50 µl

Amplifikační reakce probíhala v termocycleru při teplotním cyklu:

*Tab.7. Teplotní cyklus PCR při použití LA polymerázy (Top-Bio)*

počet cyklů	teplota	čas	část cyklu
1x	94°C	1 min	Počáteční denaturace
35x	94°C	15 sec	Denaturace
	55°C	1 min	Připojení primerů
	68°C	4 min	Elongace
1x	68°C	30 min	Závěrečná elongace

Tab.8. Reakční směs s použitím Taq DNA polymerázy (Fermentas)

10x Pufr	5 µl
4 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
dNTP (2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	3 µl
Monides SSUF (10 pmol/µl)	5 µl
Monides SSUR (10 pmol/µl)	5 µl
Taq polymeráza (5U/µl)	1 µl
DNA	5 µl
H <sub>2</sub> O	doplnit do 50 µl

Amplifikační reakce probíhala v termocykleru při teplotním cyklu:

Tab.9. Teplotní cyklus PCR při použití Taq DNA polymerázy (Fermentas)

počet cyklů	teplota	čas	část cyklu
1x	94°C	5 min	Počáteční denaturace
35x	94°C	1 min	Denaturace
	55°C	1 min	Připojení primerů
	72°C	3 min	Elongace
1x	72°C	15 min	Závěrečná elongace

Tab.10. Reakční směs s použitím EmeraldAmp<sup>®</sup> MAX PCR „Master Mix“

Monides SSUF (10 pmol/µl)	1,25 µl
Monides SSUR (10 pmol/µl)	1,25 µl
Master Mix (2x Premix)	12,5 µl
DNA	5 µl
H <sub>2</sub> O	doplnit do 25 µl

Tab.11. Reakční směs s použitím Combi PPP „Master Mix“ (Top-Bio)

Monides SSUF (10 pmol/µl)	1,25 µl
Monides SSUR (10 pmol/µl)	1,25 µl
Master Mix (2x conc. + Mg <sub>2</sub> <sup>+</sup> )	12,5 µl
DNA	5 µl
H <sub>2</sub> O	doplnit do 25 µl



Tab.12. Teplotní cyklus PCR při použití EmeraldAmp<sup>®</sup> MAX PCR „Master Mix“ nebo Combi PPP „Master Mix“ (Top-Bio)

počet cyklů	teplota	čas	část cyklu
1x	94°C	5 min	Počáteční denaturace
35x	94°C	1 min	Denaturace
	55°C	1 min	Připojení primerů
	72°C	3 min	Elongace
1x	72°C	15 min	Závěrečná elongace

### 6.3.2 Amplifikace $\alpha$ -TUBULINU

PCR metodou byla dále amplifikována část genu pro  $\alpha$ -tubulin. Pro tuto reakční směs viz Tab.14 jsme použili Combi PPP „Master Mix“ (Top-Bio) a primery z Tab.13.

Tab.13. Primery použité pro amplifikaci  $\alpha$ -tubulinu

Název	Sekvence 5' → 3'
ATUB A	RGT NGG NAA YGC NTG YTG GGA
ATUB B	CCA TNC CYT CNC CNA CRT ACC A

Tab.14. Reakční směs pro amplifikaci  $\alpha$ -tubulinu s použitím Combi PPP „Master Mix“ (Top-Bio)

ATUB A (10 pmol/ $\mu$ l)	1,25 $\mu$ l
ATUB B (10 pmol/ $\mu$ l)	1,25 $\mu$ l
Master Mix (2x conc. + Mg <sup>2+</sup> )	12,5 $\mu$ l
DNA	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	doplnit do 25 $\mu$ l

Tab.15. Teplotní cyklus PCR pro  $\alpha$ -tubulin s použitím Combi PPP „Master Mix“ (Top-Bio)

počet cyklů	teplota	čas	část cyklu
1x	94°C	5 min	Počáteční denaturace
35x	94°C	1 min	Denaturace
	58°C	1 min	Připojení primerů
	72°C	3 min	Elongace
1x	72°C	15 min	Závěrečná elongace

### 6.3.3 Elektroforéza amplifikované DNA

Správnost a kvalita amplifikované DNA byla ověřena pomocí horizontální elektroforézy. Vytvořili jsme 1% horizontální gel skládající se z agarózy (Gibco), TAE buffer (50x) Molecular biology grade (AppliChem). Tyto složky byly smíchány v Erlenově baňce, její obsah byl přiveden k varu. Následně byla baňka se směsí ochlazená a byl do ní přidán SYBR safe (40  $\mu$ l/ 40 ml), což je látka zviditelňující DNA. Gel byl nalit do plastové formy, do níž byl vložen plastový hřebínek s jamkami odpovídajícími počtu vzorků. Gel tuhnul po dobu 20 min. Do vzniklých jamek byly napipetovány naše vzorky, a také velikostní standard. Vlastní elektroforéza probíhala asi 40 minut při napětí 100 V (10V/cm). Elektroforetický gel byl vyfocen.

### 6.4 Purifikace PCR produktů

Pro purifikaci PCR produktů byly použity dva komerčně dodávané kity. Výběr kitu byl dán čistotou PCR produktů. Pokud bylo podle velikostního standardu na elektroforéze odečteno, že námi požadovaný fragment pro 18S SSU rDNA (odpovídající 3000 bp) nebo v případě genu pro  $\alpha$ -tubulin (odpovídající 1100 bp) se vyskytuje sám bez dalších fragmentů, byl tento produkt přečištěn pomocí kitu DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research) dle přiloženého protokolu. DNA byla eluována do 10  $\mu$ l sterilní destilované H<sub>2</sub>O. Výsledná koncentrace přečištěné DNA byla změřena pomocí spektrofotometru (NanoDrop® ND-1000) a použita do sekvenační reakce nebo uskladněna při -20°C.

V případě, že se v reakci naamplifikovalo více fragmentů, byly vybrané fragmenty vyříznuty sterilním skalpelem a přečištěny kitem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit

(Zymo Research), DNA byla eluována do 10  $\mu$ l sterilní destilované H<sub>2</sub>O a dále se postupovalo stejně jako v předchozím případě.

## 6.5 Klonování do kompetentních buněk *Escherichia coli*

Pokud se nám nepodařilo získat dostatečné množství čistých PCR produktů pro sekvenaci, bylo nezbytné tyto vzorky zaklonovat do bakterií. K tomuto účelu byl použit komerční kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) a kompetentní buňky *Escherichia coli* JM109 High Efficiency Competent Cells (Promega). Tato metoda je založena na selekci bakterií, díky resistenci k antibiotiku ampicilinu, rovněž také na bakterie obsahující inzert a bakterie bez inzertu (bílé/modré kolonie). Takto jsme tedy získali větší množství čisté DNA inzertu, která byla následně osekvenována.

### 6.5.1 Příprava ligační reakce

Mimo prostor laboratoře (z obavy před kontaminací) byla vytvořena ligační reakce viz *Tab.16*, která se nechala ligovat přes noc v lednici při 4°C nebo alternativně 1 hodinu při 24°C.

*Tab.16. Složení ligační reakce*

2x Ligační pufr	5 $\mu$ l
pGEM plasmidy (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
T4 ligáza (3U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
PCR produkty (ideálně 150 ng)	3 $\mu$ l

### 6.5.2 Transformace buněk

- 1) Kompetentní buňky byly rozmrazeny na ledu po dobu 5 minut, pak k nim byla napipetována ligační reakce (10  $\mu$ l) a vytvořená směs byla inkubována na ledu 20 minut.
- 2) Poté byla mikrozkušavka se směsí podrobena teplotnímu šoku při 42°C po dobu 45 sekund, po uplynutí této doby byla okamžitě vrácena na led na 2 minuty.
- 3) K buňkám bylo přidáno 250  $\mu$ l SOC média (viz *Tab.2*) a nechaly se inkubovat 90 minut na třepačce při 37°C, 220 rpm.

- 4) Dále byly připraveny kultivační LB plotny (viz *Tab.4*), na které byla bakteriální kličkou rozetřena směs viz *Tab.17*.
- 5) Po inkubaci buněk (bod 3) bylo na kultivační plotny vyseto 200  $\mu$ l buněk.
- 6) Plotny byly nechány v termostatu přes noc při 37°C.

*Tab.17. Směs na potírání kultivačních ploten*

X-GAL (50 mg/ml)	20 $\mu$ l
Ampicilin (200 mg/ml)	25 $\mu$ l
0,1M IPTG	100 $\mu$ l

### 6.5.3 Colony PCR a izolace plasmidů

Do mikrozkupek s 10  $\mu$ l destilované vody byly pomocí špiček automatické pipety přeneseny narostlé pozitivní (bílé) bakteriální kultury, dále byly vzorky vloženy do termocycleru, kde došlo k degradaci buněčných stěn bakterií.

*Tab.18. Degradční program termocycleru*

počet cyklů	teplota	Čas
1x	96°C	5 min
1x	50°C	1 min 50 sec
1x	96°C	1 min 50 sec
1x	45°C	1 min
1x	96°C	1 min
1x	40°C	1 min

S takto získanou DNA byla provedena amplifikační PCR s primery Monides SSUF, Monides SSUR pokud se jednalo o gen pro SSU rDNA a s primery ATUB A, ATUB B pokud se jednalo o gen pro  $\alpha$ -tubulin (viz *Tab.5*, *Tab.13*).

Tab.19. Reakční směs pro PCR s použitím Taq DNA polymerázy (Fermentas)

10x Pufr	2 $\mu$ l
4 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6 $\mu$ l
dNTP (2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1,2 $\mu$ l
Monides SSUR/ ATUB A (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Monides SSUF/ ATUB B (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Taq polymeráza (5U/ $\mu$ l)	0,4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	doplnit do 10 $\mu$ l
Bakteriální lyzát	10 $\mu$ l

Tab.20. Teplotní cyklus PCR při použití Taq DNA polymerázy (Fermentas)

počet cyklů	teplota	čas	Část cyklu
1x	94°C	5 min	Počáteční denaturace
35x	94°C	1 min	Denaturace
	55°C/ 58°C*	1 min	Připojení primerů
	72°C	3 min	Elongace
1x	72°C	15 min	Závěrečná elongace

Tab.21. Reakční směs s použitím LA polymerázy (Top-Bio)

10x LA pufr (+ MgCl <sub>2</sub> )	2 $\mu$ l
dNTP (10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,6 $\mu$ l
DMSO	0,4 $\mu$ l
Monides SSUR/ ATUB A (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Monides SSUF/ ATUB B (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
LA polymeráza (5U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	doplnit do 10 $\mu$ l
Bakteriální lyzát	10 $\mu$ l

Tab.20. Teplotní cyklus PCR při použití Taq DNA polymerázy (Fermentas) - \* je označena teplota pro připojení primerů pro  $\alpha$ -tubulin.

Tab.22. Teplotní cyklus PCR při použití LA polymerázy (Top-Bio)

počet cyklů	teplota	čas	Část cyklu
1x	94°C	1 min	Počáteční denaturace
35x	94°C	15 sec	Denaturace
	55°C/ 58°C*	1 min	Připojení primerů
	68°C	4 min	Elongace
1x	68°C	30 min	Závěrečná elongace

Potvrzení, zda se nám podařilo zaklonovat náš inzert do kompetentních buněk, jsme získali provedením horizontální gelové elektroforézy viz kap.2.3.3.

Připravili jsme si zkumavky Falcon se 4 ml LB média (viz Tab.3), 4 µl ampicilinu (200 mg/ml) a přidali k nim pomocí automatické pipety část pozitivních kolonií obsahující inzert požadované délky. Buňky jsme nechali inkubovat přes noc v třepačce (37°C, 220 rpm). Následující den jsme část narostlých buněk zamrazili pro pozdější zpracování, druhá část byla použita jako materiál k izolaci plasmidů.

Při zmrazování jsme do připravených mikrozkuvek napipetovali 850 µl narostlých buněk, dále 150 µl 80% glycerolu, celý obsah byl zvortexován a uskladněn v -80°C.

K vlastní izolaci plasmidů z narostlých buněk byl použit High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) a postupovali jsme dle přiloženého protokolu. Množství získané DNA bylo změřeno na spektrofotometru (NanoDrop® ND-1000) a následně použito do sekvenační reakce nebo uchováno v mrazicím boxu při -20°C.

## 6.6 Sekvence DNA

Materiálem pro sekvenační reakce byly přečištěné PCR produkty nebo vyizolované z plasmidů. Vzorok pro sekvenování byly připravovány do mikrozkuvek přidáním H<sub>2</sub>O, primeru a DNA (viz Tab.23). Primery SP6 a T7 jsou komplementární s plasmidem, takže byly používány jen při sekvenaci DNA fragmentů z plasmidů. Veškerá sekvence DNA byla provedena Sekvenační laboratoří PřF UK.

---

Tab.22. Teplotní cyklus PCR při použití LA polymerázy (Top-Bio) - \* je označena teplota pro připojení primerů pro  $\alpha$ -tubulin.

Tab.23. Složení sekvenační reakce

Primer	1 $\mu$ l (3,2 pmol/ $\mu$ l); 0,32 $\mu$ l (10 pmol/ $\mu$ l)
DNA	100 ng/ 1 kbp
H <sub>2</sub> O	Doplňit do 14 $\mu$ l

Tab.24. Použité primery při sekvenaci genu pro  $\alpha$ -tubulin

Název	Sekvence 5' → 3'
SP6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TA
ATUB A	RGT NGG NAA YGC NTG YTG GGA
ATUB B	CCA TNC CYT CNC CNA CRT ACC A
$\alpha$ TUB 350R	AGG AAC TGG TGC TGG
$\alpha$ TUB 930F	TTA GCC ATC ATR TTT G

Tab.25. Použité primery při sekvenaci genu pro SSU rDNA

Název	Sekvence 5' → 3'
Monoides SSUR	TCA CCT ACG GAA ACC TT
Monoides SSUF	GAA GTC ATA TGC TGT CTC AA
Medlin A	CTG GTT GAT CCT GCC AG
Medlin B	TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TA
Monides 377R	TCA GGC TCC CTC TCC GG
Monides 377F	CCG GAG AGG GAG CCT GA
577R	ACC GCG GCK GCT GGC
577F	GCC AGC AGC CGC GGT
866R	CAT ACT YCC CCC AGA AC
Monides 866F	GTT CTG GGG GRA GTA TG
Monides 1100F	GAA GAA AAT GGA GTG T
1262R	CGG CCA TGC ACC ACC
1262F	GGT GGT GCA TGG CCG
Mon1300R	TAA TGT GRT CAG TAG CGA

Tab.25. Použité primery při sekvenaci genu pro SSU rDNA (pokračování)

Název	Sekvence 5' → 3'
1510R	GGG CAT CAC AGA CCT G
1510F	CAG GTC TCT GAT GCC C
Mon1534F	GAT TAA GAG GGA CAG TTG GG
Mon1600R	TCT TGA TTA ATG AAA AC
1705R	ACG GGC GGT GTG TAC
SSU-Neocub R	TCT AAA CTT GTT GAT TTA ATC AG

## 6.7 Skládání sekvencí a fylogenetické analýzy

Čtení sekvencí byla porovnána se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí algoritmu BLAST. Po ověření jejich příslušnosti do námi požadované skupiny, byly fragmenty poskládány do jedné sekvence (contigu) v programu SeqMan (součást balíku DNASTAR). Nakonec byly ze sekvencí odstraněny koncové primery a hotový contig uložen ve formátu FASTA.

### 6.7.1 Tvorba a úprava alignmentu

Pro přípravu alignmentu byly nejprve staženy publikované sekvence oxymonád a rodu *Trimastix* z databází. V případě SSU rDNA byly tyto sekvence získány z databáze SILVA ([www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)), kde jsou zalignovány podle sekundární struktury. K tomuto alignmentu byly v programu ClustalX (Thompson a kol., 1997) přialignovány námi získané sekvence. Získaný alignment byl následně ručně upraven v programu BioEdit 7.0.9.0. (Hall, 1999), kde z něj byly vyňaty variabilní oblasti, které nebylo možné zalignovat a které by negativně ovlivnily naši analýzu. Bylo nutné rovněž ořezat začátek i konec alignmentu. Výsledná délka alignmentu sekvencí genu pro SSU rDNA použitého pro fylogenetickou analýzu byla 1267 bp. Protože některé sekvence jsou jen částečné, připravili tedy jsme alignmenty dva. Druhý alignment byl složený pouze z kompletních sekvencí o stejné výsledné délce a byl také použit pro fylogenetickou analýzu.

V případě alignmentu  $\alpha$ -tubulinů byly sekvence získány z databáze GenBank. Ty byly zalignovány s námi získanými sekvencemi v programu BioEdit 7.0.9.0. (Hall, 1999), kde byl alignment také následně ručně upraven. Konečná velikost alignmentu byla 677 aminokyselin.



### 6.7.2 Tvorba fylogenetických stromů

Fylogenetické stromy z obou alignmentů byly konstruovány metodami maximální věrohodnosti (maximum likelihood, ML) v programu RAxML (STAMATAKIS, A., 2006) a Bayeskou metodou v programu MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck a Ronquist 2001). Pomocí internetového serveru <http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/index.php> byla provedena analýza maximum likelihood (model GTR + I +  $\Gamma$ ), a také rovněž bootstrapová analýza pro odhad statistické podpory získané topologie. Bayeská analýza byla provedena s modelem GTR +  $\Gamma$  + I + covarion. Počet generací Markov chain Monte Carlo pro alignment vytvořený pouze z kompletních sekvencí byl běžel MCMC 8 811 000 generací, každou 1000. generaci byla zaznamenávána topologie stromů. Prvních 705 stromů bylo odstraněno jako „burnin“. Ze zbylých stromů byl vytvořen konsenzus. MCMC s druhým alignmentem vytvořeným ze všech námi získaných (i nekompletních) sekvencí nedosáhl konvergence ani po 15 042 000 generací Markov chain Monte Carlo. Po 5 000 000 generací došlo k zastavení růstu likelihoodů, a proto prvních 5 000 stromů bylo odstraněno jako „burnin“. Program MrBayes spočítal odhady Bayeské „posterior probability“ jednotlivých větví. Ke zhotovení fylogenetických stromů byl použit program FigTree 1.3.1., finální vzhled stromů byl dotvořen pomocí programu CorelDRAW X3 (verze 13).

### 6.7.3 Testování monofylie rodu *Monocercomonoides*

Naše fylogenetická hypotéza o monofylii rodu *Monocercomonoides* byla testována metodou AU test (Shimodaira, 2002). Pro provedení tohoto testu jsme připravili soubor 101 topologií stromů, který obsahuje nejlepší strom z analýzy ML a dále 100 stromů z bootstrapových replikátů ML analýzy z programu RAxML. V programu PAUP\*4.0beta (Swofford, 1998) s modelem GTR + I +  $\Gamma$  byly vypočítány „site likelihood“ pro všech 101 topologií, které sloužily jako vstupní data pro AU test. Parametry modelu byly optimalizovány pro každou topologii zvlášť. AU test byl proveden v programu ConSel (V0.1) se základním nastavením.

## 6.8 Morfologie

Z dobře narostlých kultur jsme vytvořili vlhké roztěry na podložní skla, které jsme nejprve fixovali Bouin-Hollandovou fixází a pak jsme je převedli alkoholovou řadou. Dále byly preparáty barveny protargolovou metodou dle Nie (1950), tento protokol byl upraven (viz Smejkalová, 2010). Kvalita preparátů byla zkontrolována dr. Čepičkou pomocí světelného mikroskopu. Preparáty jsme mikroskopovali (OLYMPUS BX51) a fotili digitálním fotoaparátem (OLYMPUS DP71) při zvětšení 1000x. pomocí programu QuickPHOTO MICRO 2.2. Pořídili jsme tak několik fotografií jednoho objektu v různých rovinách ostrosti, které jsme pak pomocí programu Helicon Focus mohli poskládat do jedné fotografie. Finální úprava fotografií byla provedena v programu Corel PHOTO-PAINT.

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Izoláty DNA

Přehled izolátů DNA, které byly použity pro tuto práci je v *Tab.26*. Většinu materiálu jsem dostala k dispozici od dr. Hampla, dále jsem pro naši studii používala kmeny CET1, ESMI2, EUDIA3, EPHI, GNOR1, GNOR4, INCA, LUCA2 získané od Mgr. Pavly Smejkalové. Kmen VAV 1B byl poskytnut prof. Vávrou, tento vzorek je výjimečný oproti ostatním, protože jako jediný nepochází z čerstvého střevního obsahu, ale z dlouhodobě nepoužívaného septiku. Kmen Periplaneta byl dovezen z Amerického kontinentu od Jeffreyho Silbermana, University of Arkansas.

Všechny kmeny byly pěstovány za přítomnosti bakterií v polyxenické agnotobiotické kultuře při pokojové teplotě. V některých kulturách byly kromě oxymonád také přítomni další střevní prvoci, zejména trichomonády a diplomonády.

DNA všech kmenů je k dispozici na Katedře parazitologie PřF UK, bohužel některé kultury nebyly zcela stabilní a během naší práce zanikly, jmenovitě B1-10, CET1, CYRT, EPHI, GNOR1, INCA, LUCA2, Periplaneta a MALA.

*Tab.26. Výčet izolátů DNA*

<b>Pracovní název</b>	<b>Hostitel</b>
ARCH1	<i>Archimandrita tessellata</i> (Blattodea)
B1-10 <sup>2</sup>	<i>Bos taurus</i> (Mammalia)
BAT1 <sup>1</sup>	<i>Blaberus propus</i> (Blattodea)
BOA	<i>Boa constrictor</i> (Reptilia)
CAVIA-M	<i>Cavia porcellus</i> (Mammalia)
CEAE <sup>2</sup>	<i>Cetonischema aeruginosa</i> (Coleoptera)
CET1	<i>Cetonia aurata</i> (Coleoptera)
CYRT	<i>Cyrtodactylus kotschy</i> (Reptilia)
ESMI2 <sup>1,2</sup>	<i>Eudicella smithi bertherandi</i> (Coleoptera)
EUBLAB	<i>Eublaberus</i> (Blattodea)
EUDIA3 <sup>1,2</sup>	<i>Eudicella aethiopica</i> (Coleoptera)
EPHI	<i>Ephibolus pulchripes</i> (Myriapoda)
GNOR1	<i>Gnorimus tibialis</i> (Coleoptera)
GNOR4 <sup>1</sup>	<i>Gnorimus tibialis</i> (Coleoptera)
CHAM1 <sup>1,2</sup>	<i>Chamaeleo cristatus</i> (Reptilia)
INCA	<i>Incala</i> sp. (Coleoptera)
LEI <sup>1,2</sup>	<i>Leiocephalus carinatus</i> (Reptilia)
LUCA2	<i>Lucanidae</i> (Coleoptera)
MALA <sup>2</sup>	(Myriapoda)

Tab.26. Výčet izolátů DNA (pokračování)

Pracovní název	Hostitel
MEC	<i>Mecynorhina ugadensis</i> (Coleoptera)
NEOCUB-termit	<i>Neotermes cubanus</i> (Isoptera)
OEV <sup>2</sup>	<i>Ophisops elegans</i> (Reptilia)
Pa203 <sup>1,2</sup>	<i>Chinchilla lanigera</i> (Mammalia)
Pas	<i>Pachnoda fasciata</i> (Coleoptera)
Periplaneta	<i>Periplaneta americana</i> (Blattodea)
PF	<i>Pachnoda thoracica</i> (Coleoptera)
POTCUPRI <sup>1</sup>	<i>Potosia cuprea</i> (Coleoptera)
POTFIB <sup>1</sup>	<i>Potosia fieberi</i> (Coleoptera)
RHYMAN1	<i>Rhyparobia maderae</i> (Blattodea)
TENE79 <sup>1</sup>	<i>Testudo marginata</i> (Reptilia)
Velká	(Myriapoda)
VAV 1B <sup>1</sup>	volně žijící – septik

<sup>1</sup> kmeny dlouhodobě vedené v kulturách

<sup>2</sup> kmeny, u kterých byl určován typ genetického kódu

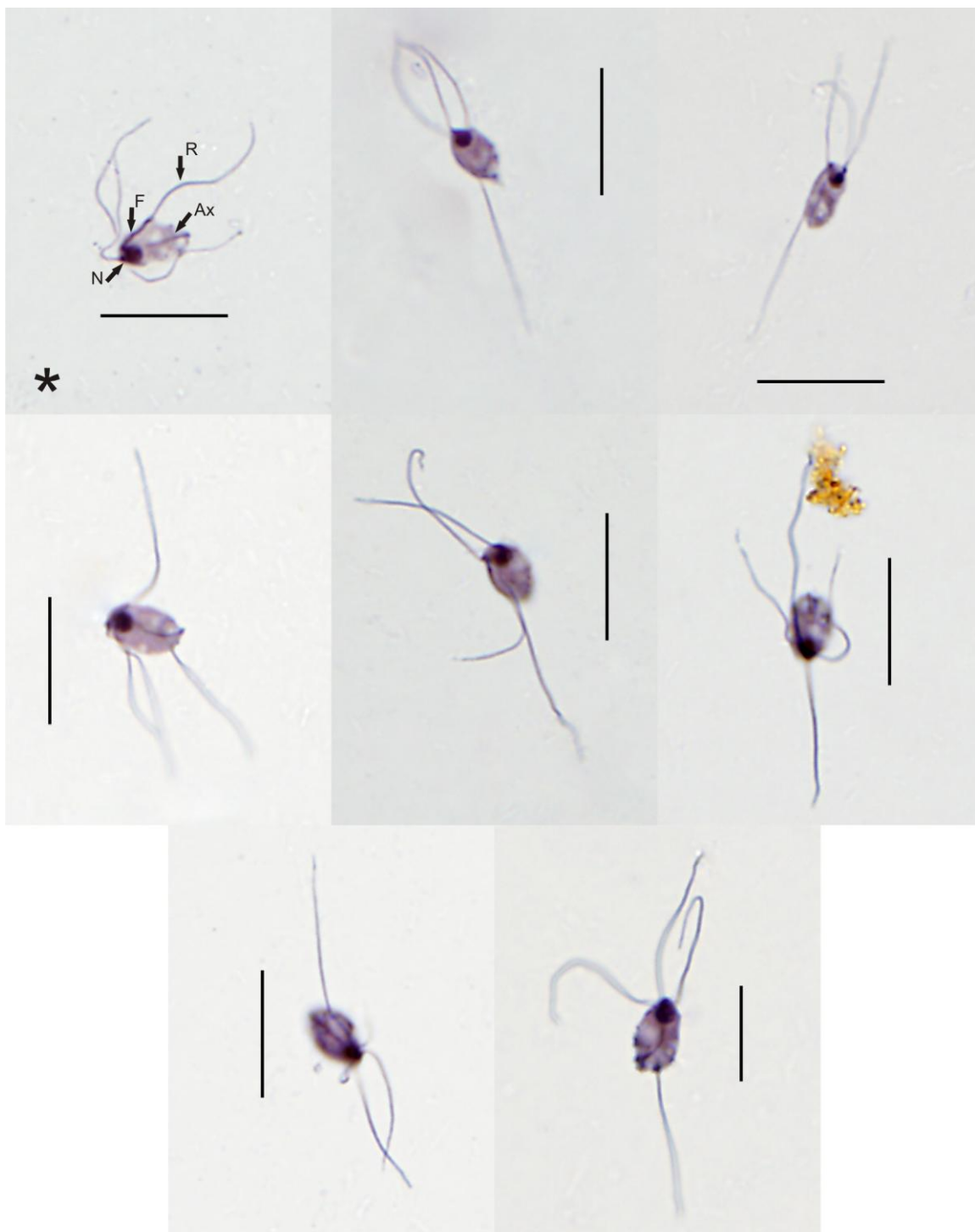
## 7.2 Morfologie a druhová determinace izolátů

Morfologii jsme zkoumali u kmenů OEV, LEI z plazích hostitelů a kmenů B1-10, CAVIA-M ze savců. Z jejich kultur byly připraveny vlhké roztěry, které jsme nafixovali a následně nabarvili protargolem. Reprezentativní fotografie pořízené z námi vytvořených preparátů jsou umístěny na obrazové tabuli č.1 – 3. Fotografie kmene CAVIA-M nejsou k dispozici, protože byly nafoceny s nízkým rozlišením a preparáty CAVIA-M byly celkově nekvalitní. Z fotografií můžeme vidět, že u všech zástupců jsou přítomny charakteristické znaky pro rod *Monocercomonoides*: čtyři dlouhé bičíky uspořádané do dvou oddělených párů, axostyl, funis podkládající zpětný bičík, kulaté jádro s výrazným endosomem, který je nejlépe patrný u zástupců kmene OEV. Ani pozorným prohlížením preparátů jsme nenalezli žádný kvalitativní rozdíl mezi kmeny, a proto jsme přistoupili k morfometrii. Od každého kmene bylo změřeno 50 buněk. Tyto hodnoty jsme zprůměrovali a vytvořili z nich tabulku obsahující kromě průměru také směrodatnou odchylku, a celkové rozpětí hodnot (Tab.28). Srovnáním námi naměřených hodnot s publikovanými údaji v literatuře jsme dospěli k názoru, že zástupci kmene OEV patří do rodu *Monocercomonoides lacerte* (obr.tab. č.3), zástupci kmene B1-10 jsme určili jako rod *M. bovis* (obr.tab. č.1). Pro kmeny LEI a CAVIA-M jsme nenalezli shodu mezi námi naměřenými údaji a těmi publikovanými.

Tab.28. Rozměry (v  $\mu\text{m}$ ) zástupců různých kmenů rodu *Monocercomonoides* barvených protargolem. V tabulce uvádíme průměr 50 měření,  $\pm$  směrodatnou odchylku (nejmenší hodnotu-největší hodnotu).

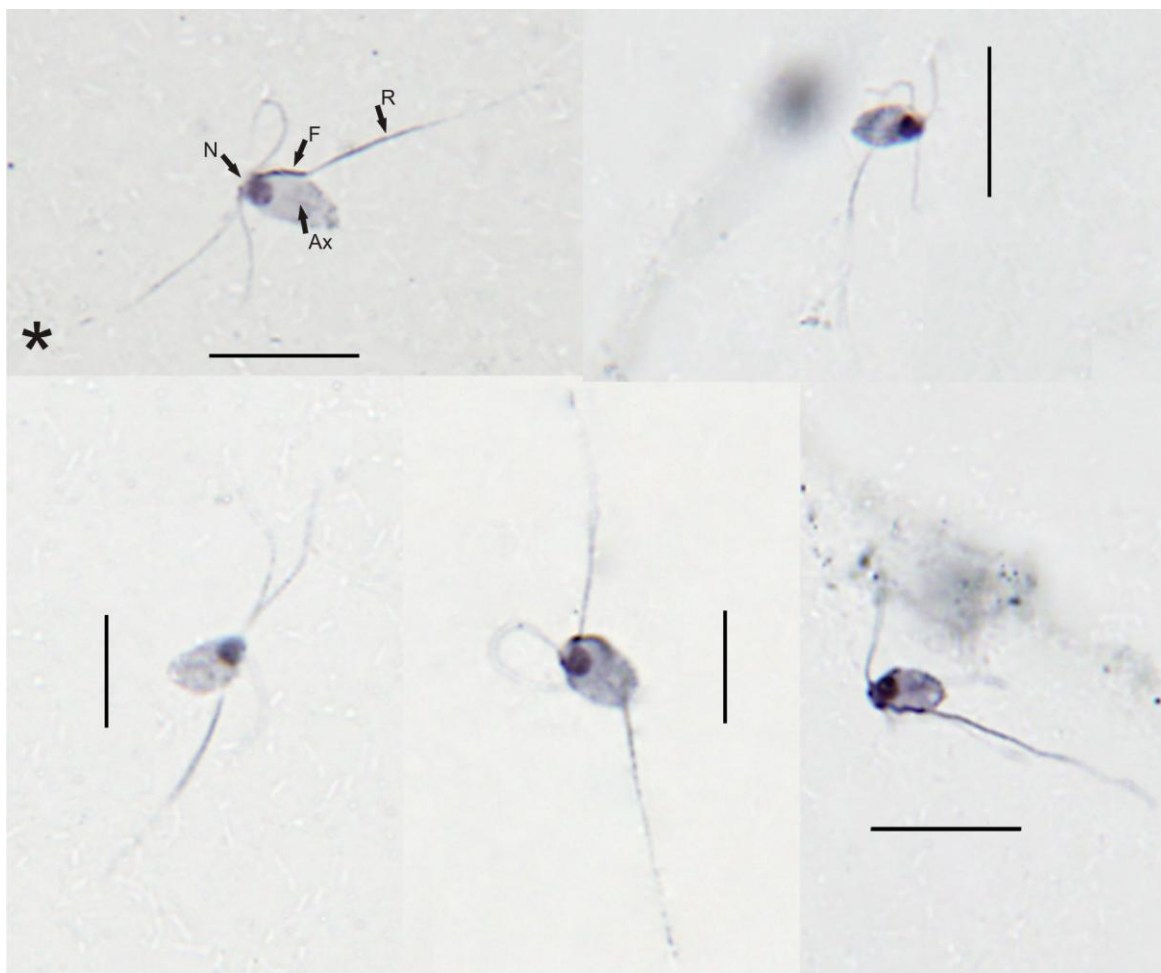
Kmen	Délka buňky	Šířka buňky	Délka buňky/ šířka buňky	Jádro	Délka zpětného bičíku (4)	Délka bičíku(3)	Délka bičíku (4) / délka bičíku (3)
OEV	$6.49 \pm 0.87$ (5 - 8.4)	$4.13 \pm 0.70$ (2.9 - 5.5)	$1.60 \pm 0.27$ (1.16 - 2.19)	$1.88 \pm 0.25$ (1 - 2.4)	$26.06 \pm 3.04$ (18.6 - 34.3)	$14.94 \pm 2.03$ (11.9 - 19.4)	$1.77 \pm 0.22$ (1.43 - 2.23)
B1-10	$5.54 \pm 0.62$ (4 - 6.6)	$3.29 \pm 0.36$ (2.5 - 4)	$1.7 \pm 0.25$ (1.29 - 2.33)	$1.59 \pm 0.16$ (1.1 - 2)	$17.65 \pm 2.09$ (12.6 - 24.2)	$11.3 \pm 1.78$ (7.8 - 14.6)	$1.64 \pm 0.29$ (0.98 - 2.37)
LEI	$5.67 \pm 0.82$ (4 - 7.1)	$3.50 \pm 0.42$ (2.7 - 4.6)	$1.64 \pm 0.29$ (1.08 - 2.39)	$1.68 \pm 0.18$ (1.3 - 2)	$19.54 \pm 2.73$ (12.4 - 26.5)	$12.66 \pm 1.96$ (9.2 - 17)	$1.59 \pm 0.26$ (0.98 - 2.14)
CAVIA-M	$5.42 \pm 0.98$ (3.6 - 7)	$3.12 \pm 0.34$ (2.5 - 4)	$1.74 \pm 0.31$ (1.21 - 2.59)	$1.52 \pm 0.24$ (1 - 1.9)	$16.38 \pm 2.67$ (11.2 - 21.8)	$10.82 \pm 2.20$ (6.9 - 15)	$1.56 \pm 0.27$ (1.14 - 2.23)

## Obrazová tabule č.1



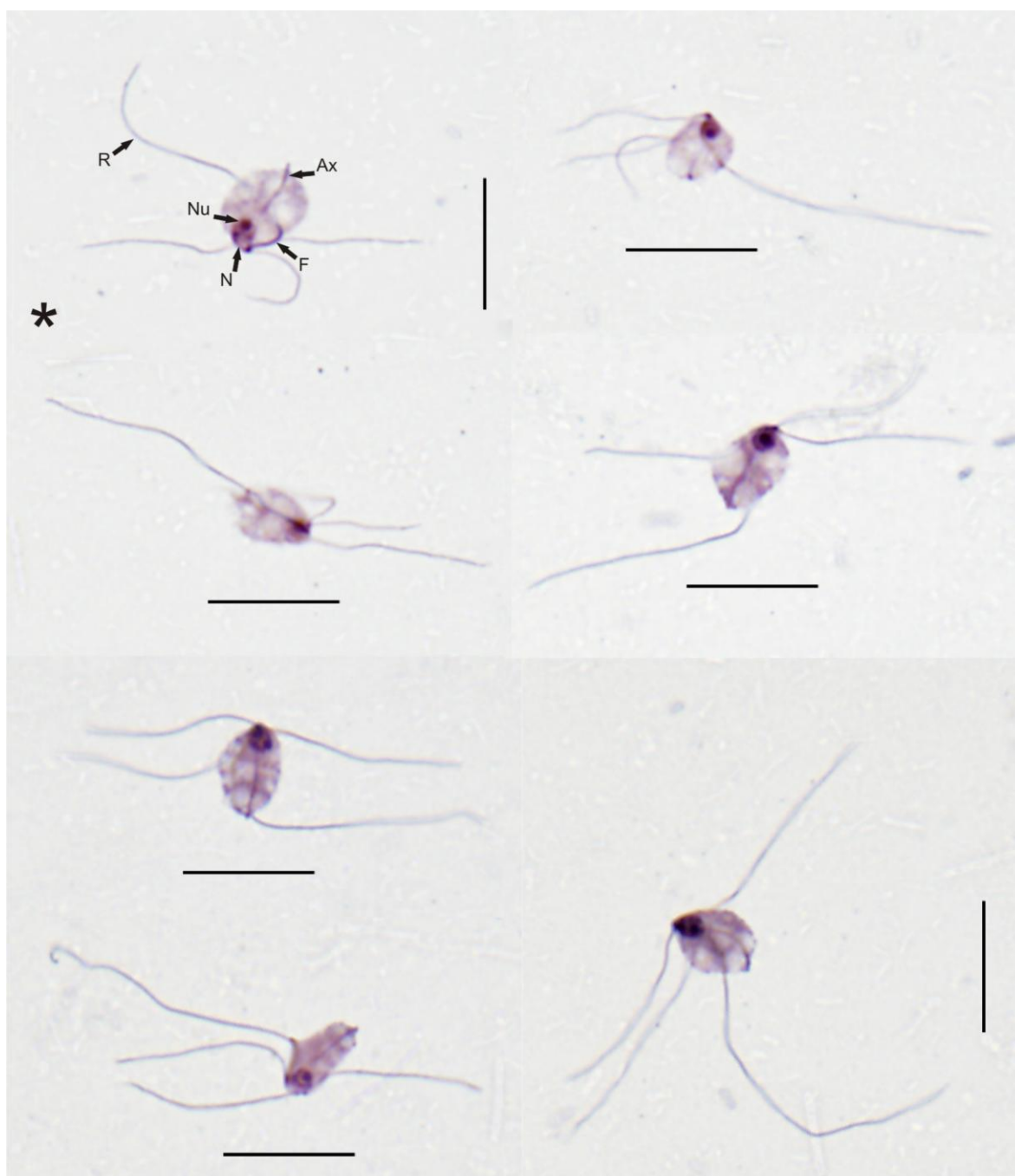
*Protargolové snímky zástupců kmene B1-10; měřítko odpovídá 10 $\mu$ m; hvězdičkou \* je označena fotka poskládaná z více rovin ostrosti, N – jádro, F – funis, R – zpětný bičík, Ax - axostyl*

## Obrazová tabule č.2



*Protargolové snímky zástupců kmene LEI; měřítko odpovídá 10 $\mu$ m; hvězdičkou \* je označena fotka poskládaná z více rovin ostrosti, N – jádro, F – funis, R – zpětný bičík, Ax - axostyl*

### Obrazová tabule č.3



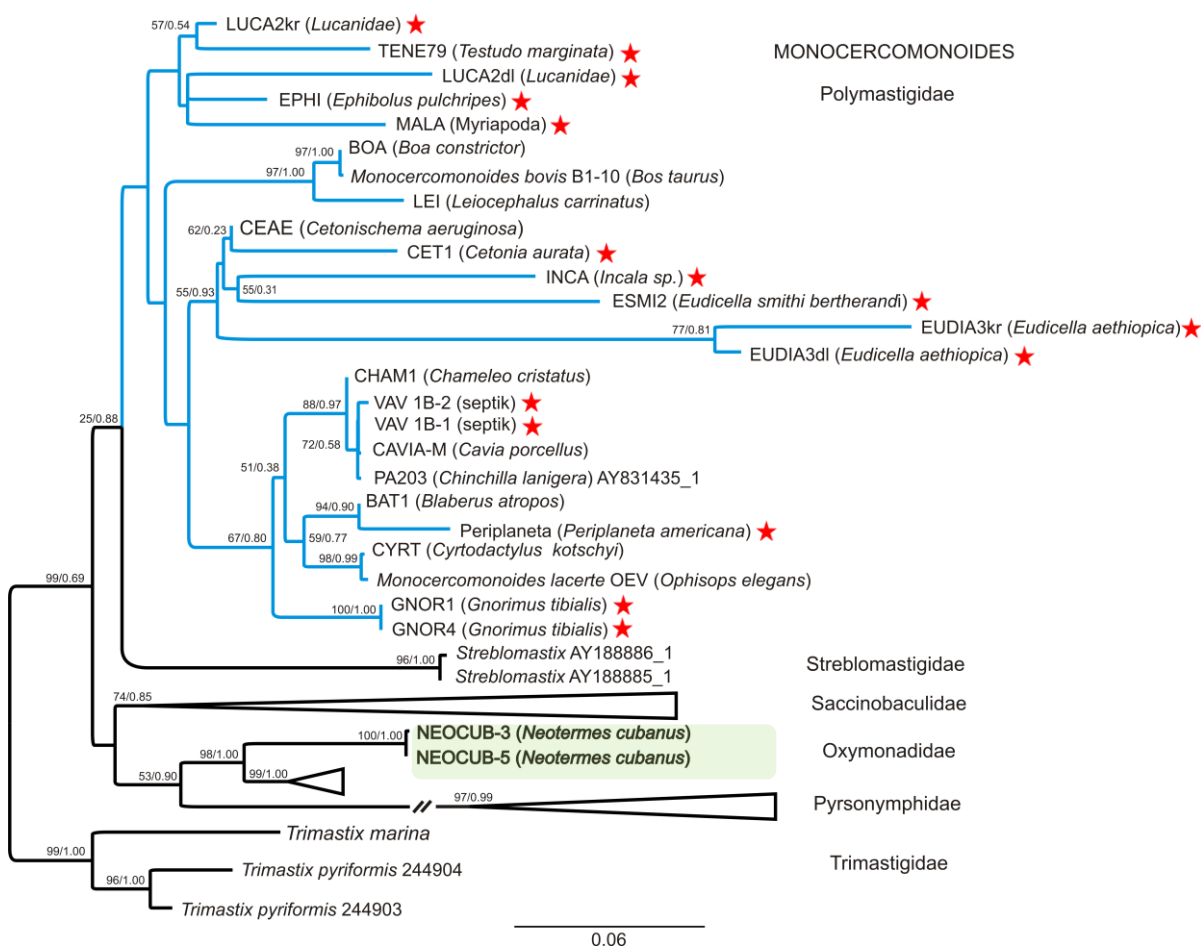
*Protargolové snímky zástupců kmene OEV; měřítko odpovídá 10 $\mu$ m; hvězdičkou \* je označena fotka poskládaná z více rovin ostrosti, N – jádro, Nu – jádérko, F – funis, R – zpětný bičík, Ax - axostyl*



### 7.3 Příbuzenské vztahy mezi izoláty

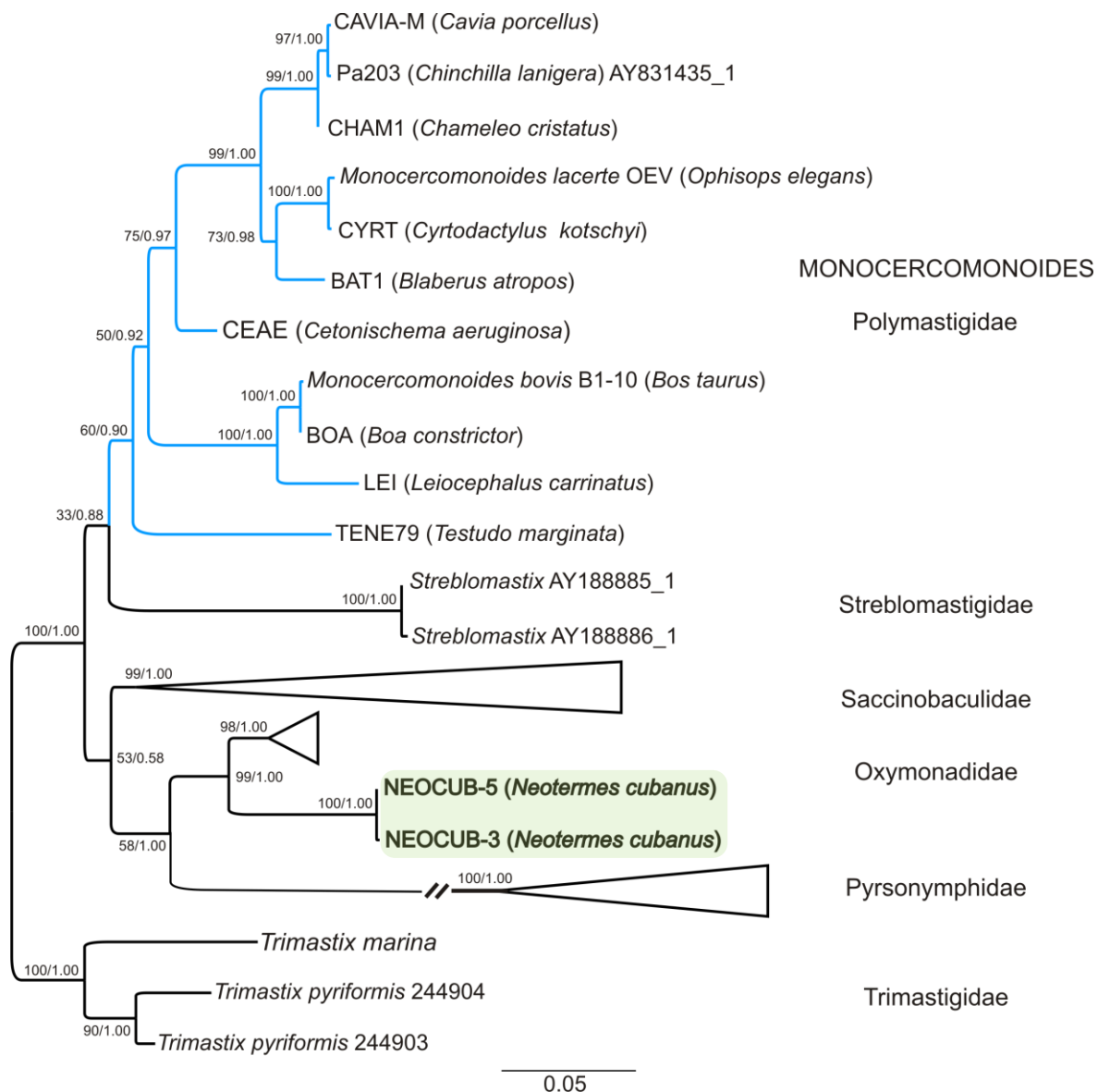
Celkem bylo získáno 26 sekvencí části genu pro SSU rDNA z různých kmenů. Některé ze sekvencí jsou zatím pouze částečné, přesto jsme s nimi dále pracovali. Kromě námi získaných sekvencí bylo do analýzy zahrnuto 26 sekvencí SSU rDNA kmenů rodu *Saccinobaculus*, 14 sekvencí SSU rDNA kmenů rodu *Dinenympha*, 11 sekvencí SSU rDNA kmenů rodu *Pyrsonympha*, 3 sekvence SSU rDNA kmenů rodu *Oxymonas*, 3 sekvence SSU rDNA kmenů rodu *Trimastix* (Preaxostyla), 2 sekvence SSU rDNA kmenů rodu *Streblomastix* a 1 sekvence SSU rDNA kmene Pa203 rodu *Monocercomonoides* získaných z genomové databáze GenBank.

Fylogenetické stromy ze sekvencí genu pro SSU rDNA (Obr.5, 6) byly konstruovány metodou maximální věrohodnosti (maximum likelihood, ML) v programu RAxML a Bayeskou metodou v programu MrBayes.



Obr.5. Fylogenetický strom podle genu pro SSU rDNA třídy Anaeromonadea (Cavalier-Smith, 1996), zakořeněný rodem *Trimastix*. Topologie byla získána analýzou ML v programu RAxML (GTR + I + G model). Číselné hodnoty v uzlech znamenají

bootstrapovou hodnotu získané ML metodou v RAxML a metodou Bayeské posteriorní pravděpodobnosti. Hvězdičkou ★ jsou označeny částečné sekvence; kr a dl – gen pro SSU rDNA se naapmlifikoval ve dvou odlišně velkých fragmentech, u obou sekvenace prokázala, že přísluší oxymonádám kmeni, kr – kratší fragment, dl – delší fragment.



Obr.6. Fylogenetický strom podle genu pro SSU rDNA třídy Anaeromonadea (Cavalier-Smith, 1996), zakořeněný rodem *Trimastix*. po vyloučení částečných sekvencí. Topologie byla získaná analýzou ML v programu RAxML (GTR+I+G model). Číselné hodnoty v uzlech znamenají bootstrapovou hodnotu získané ML metodou v RAxML a metodou Bayeské posteriorní pravděpodobnosti.

Kořen námi vytvořených stromů tvoří rod *Trimastix*, který je oxymonádám nejbližší příbuzný.

Fylogenetická analýza podpořila monofylii rodu *Monocercomonoides*, který je sesterský k rodu *Streblomastix*. Tato monofylie je sice podpořena velmi nízkou bootstrapovou hodnotou, ale po vyloučení částečných sekvencí (označených ★) se statistická hodnota zvýšila na 60% (Obr.6). AU test provedený u tohoto souboru dat v programu Consel (V0.1) (Shimodaira a Hasegawa, 2001) ovšem ukázal, že topologie s polyfyletickým rodem *Monocercomonoides* nelze zamítnout na 5% hladině pravděpodobnosti.

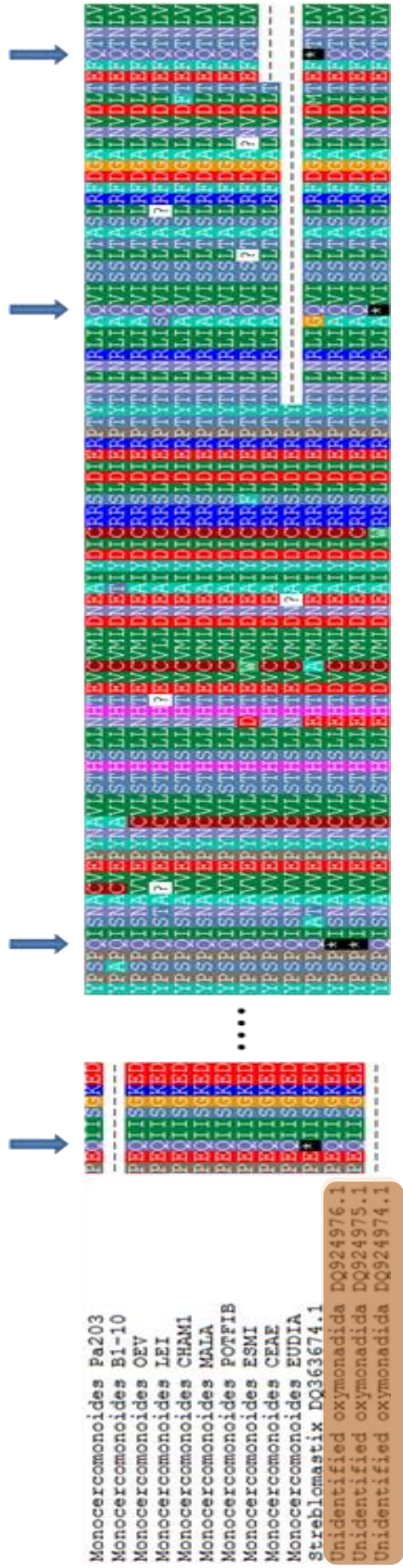
Získané sekvence dvou klonů genu pro SSU rDNA kmene NEOCUB se na fylogenetickém stromě umístily u skupiny Oxymonadidae.

## 7.4 Genetický kód

U vybraných kmenů (viz Tab. 26) jsme se pokusili zjistit, zda používají alternativní genetický kód, jako je tomu u rodu *Streblomastix* a environmentálních sekvencí získaných ze švába *Cryptocercus punctulatus* připisovaných zástupci rodu *Monocercomonoides*. Pro tento účel jsme z těchto kmenů získali 9 částečných sekvencí genu pro  $\alpha$ -tubulin. Tyto sekvence jsme „*in silico*“ přeložili do proteinu a přidali do alignmentu společně s třemi environmentálními proteinovými sekvencemi genu pro  $\alpha$ -tubulin izolované ze stěva *Cryptocercus punctulatus*, 118 proteinovými sekvencemi genu pro  $\alpha$ -tubulin rodu *Saccinobaculus*, 26 proteinovými sekvencemi genu pro  $\alpha$ -tubulin z neidentifikovatelných zástupců skupiny Oxymonadida a 1 proteinové sekvence genu pro  $\alpha$ -tubulin rodu *Streblomastix* získané z genomové databáze GenBank.

Alignment z částečných sekvencí genu pro  $\alpha$ -tubulin byl vytvořen a následně ručně upraven v programu BioEdit 7.0.9.0. Vybraná část alignmentu (Obr.7) ilustruje skutečnost, že v environmentálních proteinových sekvencích genu pro  $\alpha$ -tubulin izolovaných ze stěva *Cryptocercus punctulatus* je aminokyselina glutamin kódována nekanonickým genetickým kódem, tedy kodony TAA a TAG. Tento jev je patrný také v proteinové sekvenci genu pro  $\alpha$ -tubulin rodu *Streblomastix*. V námi získaných sekvencích se vyskytují místa označená v alignmentu „?“ . V těchto místech se vyskytují polymorfismy, což znamená, že kopie genu pro  $\alpha$ -tubulin v genomu tohoto kmene se mezi sebou liší přítomností nukleotidů v určitém místě sekvence, nebo že izolát je směsnou kulturou. Některé námi získané sekvence jsou zatím pouze částečné a mají nižší kvalitu, přesto můžeme konstatovat, že

jsme nikdy nepozorovali kodony TAA a TAG kódovat glutamin v pozicích, kde je tato aminokyselina u oxymonád konzervovaná. Z naší analýzy vyplývá, že zkoumané kmeny v námi osekvenované části genu používají standardní genetický kód.



*Obr. 7. Část alignmentu sekvencí genu pro  $\alpha$ -tubulin. Environmentalní proteinové sekvence genu pro  $\alpha$ -tubulin izolované ze střeva Cryptocercus punctulatus jsou označené v oranžovém rámečku. Hvězdičky \* označují pozice kodonů TAA a TAG kódující aminokyselinu glutamin. Otazníky ? označují místa výskytu polymorfismu, tj. míst, kterým nebylo možné při sekvenaci PCR produktů jednoznačně přiřadit určitou aminokyselinu.*

## 8 DISKUZE

### 8.1 Získávání nových sekvencí

Jedním z našich cílů bylo získat a analyzovat sekvenční data SSU rDNA různých zástupců rodu *Monocercomonoides*. Izoláty DNA pro tyto analýzy byly získány přímou izolací DNA ze střevního obsahu hostitele nebo izolací buněk ze zavedených kultur. Tito prvoci jsou členy mikrobiálních komunit žijící ve střevě hostitele, v některých případech je velmi obtížné přenést a udržet tyto kultury životaschopné v médiu. Doposud bylo publikováno, že se podařilo ve stabilní kultuře udržet pouze jediný kmen PA203 (z obratlovčího hostitele) rodu *Monocercomonoides* (Hampl a kol, 2005). Nám se během naší práce podařilo shromáždit 11 stabilních kultur těchto zástupců pocházejících z různých savčích i hmyzích hostitelů. Kultivace z některých hostitelů není tak obtížná, jak se všeobecně tvrdí, alespoň co se týče rodu *Monocercomonoides*.

U většiny sekvenovaných kmenů byly vytvořeny protargolem barvené preparáty, které v budoucnu poslouží pro důkladné vypracování morfologické studie. Během této diplomové práce jsme se detailně věnovali studiu morfologie jen malého zlomku kmenů, které naše sbírka obsahuje. U těchto kmenů jsme se pokusili na základě morfologických dat druhově určit některé kmeny rodu *Monocercomonoides*.

Při amplifikaci genu pro SSU rDNA jsme se potýkali s mnoha komplikacemi. Jedním z hlavních důvodů těchto komplikací je skutečnost, že rod *Monocercomonoides* stejně jako rod *Streblomastix* mají poměrně dlouhý gen pro SSU rDNA, cca 3000 nukleotidů (Hampl a kol., 2005). Délka genu pro SSU rDNA byla také problémová při pokusech o zaklonování PCR produktů do kompetentních buněk *Escherichia coli*. Tuto metodu jsme použili v případě, že naamplifikovaná DNA měla velmi nízkou koncentraci. U některých kmenů mohla být amplifikace komplikovaná z důvodu nízké koncentrace templátové DNA, protože některé kultury se nepodařilo dostatečně namnožit. Dalším problémem mohla být vysoká koncentrace bakterií při izolaci DNA z kultury. Ukázalo se, že různé typy polymeráz poskytují výrazně jiné výsledky. Nejvyšší kvalitu PCR produktů jsme získali použitím EmeraldAmp<sup>®</sup> MAX PCR „Master Mix“ při amplifikaci, kdy nebylo potřeba produkty zaklonovávat.

## 8.2 Molekulárně-fylogenetické analýzy

Evoluční pozice oxymonád byla po dlouhou dobu velice rozporuplná (Cavalier-Smith, 1998; Dacks a kol., 2001; Hampl a kol., 2005; Moriya a kol., 1998, 2001; Patterson, 1994; Simpson, 2003). Dnes víme, že oxymonády spadají mezi exkaváta (Simpson, 2003) jednak na základě molekulárních (Dacks a kol., 2001; Hampl a kol., 2005, Hampl a kol 2009), a také na základě morfologických dat, které podporují jejich příbuzenský vztah s exkavátním rodem *Trimastix* (Simpson a kol., 2002). Fylogenetické vztahy v rámci oxymonád také nejsou dostatečně objasněny. Výsledky molekulárních studií označují čeleď Polymastigidae za bazální skupinu v rámci oxymonád (Brugerolle, 1991; Moriya a kol., 2003). Další molekulární studie poskytují důkazy o blízkém příbuzenském vztahu mezi čeledí Polymastigidae a Strebloplastigidae (Hampl a kol., 2005; Heiss a Keeling, 2006). Tyto výsledky jsou ve shodě s námi získanými informacemi. Ze sekvencí SSU rRNA se nám podařilo vytvořit alignment o délce 1267 bp, jelikož většina našich sekvencí byla pouze částečná, vytvořili jsme dva fylogenetické stromy. Na stromě vytvořeném ze všech získaných sekvencí tvoří zástupci rodu *Monocercomonoides* monofyletickou skupinu s velmi nízkou bootstrapovou podporou. Odstraněním částečných sekvencí v druhém stromě se podpora zvýšila pouze na 60% (bootstrap 60/0.90). Proto jsme se rozhodli monofylii rodu *Monocercomonoides* ověřit metodou AU test. Tento test ovšem ukázal, že topologie s polyfyletickým rodem *Monocercomonoides* nelze zamítnout na 5% hladině pravděpodobnosti.

Hostitelská specifita linií rodu *Monocercomonoides* je velice variabilní. Zdá se, že neexistuje striktní koevoluce mezi těmito prvky a jejich hostiteli, a však na fylogenetickém stromě můžeme nalézt linie, které jsou specifické pro určitou skupinu hostitelů. Mezi takové můžeme zařadit kmeny EPHI a MALA pocházející z mnohonožek, tato skupina má ovšem velmi malou bootstrapovou hodnotu. Dále kmeny CEAE, CET1, INCA, ESMI2, EUDIA3kr, EUDIA3dl, které tvoří samostatnou „zlatohlávků“ skupinu (bootstrap 55). Nízká statistická podpora obou skupiny je zapříčiněna nekompletností příslušných sekvencí. Další samostatnou „švábů“ skupinu tvoří kmeny BAT1, Periplaneta (BS 94/0.90) a skupinu izolátů z plazích hostitelů tvoří kmeny CYRT a OEV (BS 98/0.99; BS 100/1.00) s vysokou bootstrapovou hodnotou v obou stromech. Do poslední samostatné tzv. „broučků“ skupiny řadíme kmeny GNOR1, GNOR4 (BS 100/1.00). Na druhou stranu najdeme v našich fylogenetických stromech dvě skupiny, jejichž členové pochází z velmi vzdálených hostitelů. První je tvořena kmeny BOA (hroznýš), B1-10 (tur) a LEI

(leguánek), které jsou v obou stromech podpořeny vysokou bootstrapovou hodnotou (BS 97/1.00; BS 100/1.00). Druhou takovou skupinu tvoří kmeny CHAM1 (chameleon), CAVIA-M (morče), PA203 (čínčila), VAV 1B-1 (septik) a VAV 1B-2 (septik) také podpořené vysokou bootstrapovou hodnotou (BS 88/0.97; BS 99/1.00) v obou stromech. Rovněž příbuzenské vztahy mezi skupinami neodpovídají vztahům mezi hostiteli.

Přesnější určení vnitřní fylogeneze čeledi Polymastigidae by bylo možné při provedení molekulární analýzy našich kmenů společně se zástupci zbývajících rodů této čeledi např. rodu *Polymastix*, ke kterým ovšem nejsou dosud žádná molekulární data k dispozici. V rámci naší práce jsme se několikrát pokoušeli získat sekvence SSU rRNA z DNA izolované ze střeva larev tiplic, ve kterých byl *Polymastix* pozorován. Naše snažení však dopadlo vždy neúspěšně.

Ne všechny námi získané sekvence patří rodu *Monocercomonoides*. Sekvence z DNA ze střevního obsahu termita *Neotermes cubanus* byla na našich fylogenetických stromech jednoznačně přiřazena k čeledi Oxymonadidae s vysokou bootstrapovou hodnotou (bootstrap 100/ 99). Tato DNA byla zahrnuta do naší analýzy z důvodu, že ve střevním obsahu termita byla pozorována oxymonáda připomínající rod *Monocercomonoides*. Mikroskopické pozorování provedl dr. Ivan Čepička a izolát DNA nám předal k podrobnější studii. I když nemůžeme s jistotou vyloučit atraktivní hypotézu, že pozorovaná oxymonáda připomínající rod *Monocercomonoides* je blízce příbuzná rodu *Oxymonas*. Mnohem pravděpodobnější se nám jeví hypotéza, že ve střevě termita se vyskytovali zástupci dvou rodů (*Monocercomonoides*, *Oxymonas*) a nám se podařilo naamplifikovat pouze jedince rodu *Oxymonas*.

### 8.3 Morfologie izolátů rodu *Monocercomonoides*

K rozlišení druhů v rámci rodu *Monocercomonoides* pomocí světelného mikroskopu jsou důležité rozdíly mezi charakteristickými znaky. K takovým znakům řadíme velikost a tvar buňky, polohu axostylu (zda vyčnívá z buňky nebo ne), délku bičíků, počet předních a zpětných bičíků, počet a délku funisů, velikost jádra a polohu endosomu. Přihlíží se také k druhu hostitele.

Doposud bylo popsáno 5 druhů rodu *Monocercomonoides* z plazů, z nichž nejvěrohodnější popis je pro *Monocercomonoides lacerte*, existence ostatní druhů byla zpochybněna a jsou považovány za konspecifické s *M. lacertae* (Moskowitz, 1951). Údaje získané z našeho fylogenetického stromu však naznačují, že by v plazích hostitelích mohlo



existovat více druhů, protože kmeny izolované z plazů se vyskytují na 5 poměrně vzdálených místech ve stromu (OEV+CYRT, CHAM1, LEI, BOA a TENE79).

Pomocí světelného mikroskopu jsme mohli mezi sebou důkladně porovnat jedince dvou našich kmenů izolovaných z plazů (LEI a CYRT). Zjistili jsme, že se od sebe neliší v kvantitativních znacích, a proto jsme přistoupili k morfometrickému měření. Tímto srovnáním jsme zjistili, že naše dva kmeny opravdu nejsou identické. Hodnoty kmene OEV odpovídaly uvedenému rozmezí hodnot pro druh *M. lacerte*. Na základě porovnání našich morfologických údajů s údaji v literatuře (viz Moskowitz, 1951) jsme tedy přiřadili zástupce kmene OEV k rodu *M. lacerte*. Publikovaným údajům neodpovídaly hodnoty získané pro kmen LEI. Na základě morfologie a pozice tohoto kmene vůči kmenu OEV na fylogenetickém stromě se domníváme, že se jedná o nový druh rodu *Monocercomonoides*.

Dalším studovaným kmenem byl CAVIA-M izolovaný z morčat. Morfologické znaky a rozměry zástupců tohoto kmene neodpovídají údajům známým pro popsání druhů z morčat (Nie, 1950). Přiřazení kmene CAVIA-M k druhům *Monocercomonoides quadrifunilis* a *Monocercomonoides wenrichi* jsme zavrhlí při porovnání charakteristických znaků pro tento rod. Na rozdíl od *M. quadrifunilis* se náš kmen nemá čtyři zpětné bičíky, z nichž každý je podložen svou vlastní funis a endosom tvaru půlměsíce umístěný na okraji jádra. Stejný tvar a umístění endosomu má další druh *M. wenrichi*, který se od našeho kmene liší také tvarem axostylu. Axostyl *M. wenrichi* má být zvlněný a znatelně vyčnívat z buňky. Druhy *Monocercomonoides cavie* i *Monocercomonoides exilis* mají s naším kmenem společné znaky, jak je kulatý endosom umístěný uprostřed jádra a vyčnívající axostyl. Oproti *M. cavie* zástupci našeho kmene nemají tři funisy a jsou celkově menší. Rozdíl mezi druhem *M. exilis* a kmenem CAVIA-M je v délce bičíků, ty jsou u našich zástupců mnohem delší. Zároveň jsme pozorovali výraznou strukturu v přední části těla, kterou nejme schopni přesně identifikovat. Hlavním důvodem obtížné identifikace byla špatná kvalita našich preparátů.

Zástupce našeho posledního zkoumaného kmene B1-10 jsme na základě porovnání námi získaných morfologických údajů s údaji uvedenými v literatuře prohlásili za jedince rodu *M. bovis* (Jensen a Hammond, 1964), jediného popsáního druhu ze skotu.

#### 8.4 Variabilita genetického kódu

Změny jaderného genetického kódu jsou velmi vzácné. Nekanonický genetický kód byl zjištěn u několika málo zástupců oxymonád. Mezi tyto zástupce patří rod *Streblomastix*

(Keeling a Leander, 2003) a tři environmentální proteinové sekvence genu pro  $\alpha$ -tubulin izolované ze střeva *Cryptocercus punctulatus* (de Koning a kol., 2008), u nichž bylo prokázáno, že aminokyselina glutamin je kódována nekanonickým genetickým kódem, tedy kodony TAA a TAG označované jako TAR kodony. Environmentální proteinové sekvence ze střeva *Cryptocercus punctulatus* byly analýzami přiřazeny k čeledi Polymastigide rodu *Monocercomonoides* (de Koning a kol., 2008). Na základě těchto dat a příbuznosti čeledi Polymastigidae a Streblomastigidae (Hampl a kol., 2005; Heiss a Keeling, 2006) jsme se rozhodli prověřit přítomnost alternativního genetického kódu u dalších zástupců rodu *Monocercomonoides*. Pro určení genetického kódu jsme získali 9 částečných sekvencí genu pro  $\alpha$ -tubulin, po zalignování sekvencí jsme získali alignment o velikost 667 bp. V námi získaných sekvencích se vyskytují polymorfní místa, což také nepřispívá k vysoké kvalitě sekvencí. Přes nedostatky a neúplnost sekvencí můžeme s jistotou říci, že jsme nikdy nepozorovali kodony TAA a TAG na pozicích konzervovaných pro aminokyselinu glutamin. Můžeme tedy konstatovat, že zkoumané kmeny v námi osekvenované části genu používají pouze standardní genetický kód. Z transkriptomu sekvencí kmene PA203 bylo zřetelné, že kmen používá všechny tři typy stop kodonů (ústní sdělení dr. Hampla). Tato skutečnost naprosto vylučuje možnost, že by tyto kodony byly používány i pro kódování glutaminu. Tímto je vyloučena přítomnost nekanonického kódu u kmene PA203. U našich ostatních kmenů nemůžeme zatím přítomnost nekanonického genetického kódu zcela vyloučit. Naše výsledky však naznačují, že tento typ kódu není u rodu *Monocercomonoides* velmi častý. Pro ustanovení konečného závěru přítomnosti nebo absence nekanonického genetického kódu u ostatních kmenů rodu *Monocercomonoides* musí být získány sekvence transkriptomů nebo dalších částí genu, v kterých bychom mohli zkontrolovat používání stop kodonů.

## 9 ZÁVĚREČNÉ SHRNU TÍ

- Povedlo se nám stabilizovat a dlouhodobě kultivovat 11 kultur různých kmenů rodu *Monocercomonoides*.
- Celkem bylo získáno 24 sekvencí pro část genu SSU rDNA rodu *Monocercomonoides* a 2 sekvence pro část genu SSU rDNA rodu *Oxymonas*. Na základě získaných dat jsme zjistili, že kmeny rodu *Monocercomonoides* tvoří monofyletickou skupinu, avšak slabě statisticky podpořenou. Některé kmeny tvoří linie specifické pro určité skupiny hostitelů, na druhou stranu jiné linie jsou tvořeny kmeny ze zcela nepříbuzných hostitelů. U plazů se vyskytuje nejméně 5 druhů rodu *Monocercomonoides*.
- Pro analýzu genetického kódu bylo získáno celkem 9 částečných sekvencí genu pro  $\alpha$ -tubulin různých kmenů rodu *Monocercomonoides*. Ukázalo se, že v námi osekvenovaném úseku se nekanonický genetický kód nevyskytuje.
- Na základě výsledků morfometrického měření porovnaných s publikovanými údaji jsme určili zástupce kmene OEV do druhu *Monocercomonoides lacerte*, zástupce kmene B1-10 do druhu *Monocercomonoides bovis*. Zástupce zbylých dvou studovaných kmenů (LEI a CAVIA-M) jsme nedokázali s jistotou přiřadit ke známým druhům rodu *Monocercomonoides*.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMP – ampicilin

BS – bootstrap

DMSO – dimethyl sulfoxid

dNTP – deoxyribonukleotidy

E $\alpha$ – elongační faktor  $\alpha$

GTR + G + I – general time reversible model s gama korekcí a s invariantami (model nukleotidové substituce)

IPTG – isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid

LB médium – „lysogeny broth“ médium

rpm – „rotates per minute“, otáčky za minutu

SSU rRNA – RNA malé podjednotky ribosomu

tRNA – transferová ribonukleová kyselina

X-gal – bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid

## 11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

*Sekundární citace jsou označeny \*.*

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

Brugerolle G., 1981. Ultrastructural-study of the parasitic flagellate *Polymastrix melolonthae* (Oxymonadida). *Protistologica* 17, 139-145

Brugerolle G., 1970. Sur l'ultrastructure et la position systématique de *Pyrsonympha vertens* (Zooflagellate Pyrsonymphina). *C R Acad Sci Paris* 270, 3474-3478

Brugerolle G., Joyon L., Oktem N., 1973. Contribution a l'étude Cytologique et Phylétique des Diplozoaires (Zoomastigophorea, Diplozoa, Dangeard 1910). II. Etude Ultrastructurale du Genre *Spironucleus* (Lavier 1936). *Protistologica* 9, 495-502

Brugerolle G., 1991. Flagellar and Cytoskeletal Systems in Amitochondrial Flagellates: Archamoeba, Metamonada and Parabasala. *Protoplasma* 164, 70-90

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

Brugerolle G., Lee JJ., 2000. Order Oxymonadida. In: *The Illustrated Guide to the Protozoa.* (Eds. Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P). Lawrence: Allen Press Inc. 2, 1186-1195

Brugerolle G., Lee JJ., 2000a. Order Oxymonadida. In: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury PC (eds) *The illustrated guide to the Protozoa II.* Society of Protozoologists, Lawrence, 1186–1195

Brugerolle G., Lee JJ., 2000b. Order Diplomonadida. In: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury PC (eds) *The illustrated guide to the Protozoa II.* Society of Protozoologists, Lawrence, 1125–1135

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

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

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

Brugerolle G., Radek R., 2006. Symbiotic protozoa of termites. In: Intestinal microorganisms of termites and other invertebrates. (Eds.König H, Varma A). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 243-269

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

Bütschli O., 1884. Protozoa, Bronn's *Klass. u Ord* Bd 1 Abt II, Leipzig

\*Caron F., Meyer E., 1985. Does *Paramecium primaurelia* use a different genetic code in its macro-nucleus? Nature 314, 185-188

Carpenter KJ., Waller RF., Keeling PJ., 2007. Surface morphology of *Saccinobaculus* (Oxymonadida): Implications for character evolution and function in oxymonads. Protist 159, 209-21

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

\* Cavalier-Smith T., 1981. The Origin and Early Evolution of the Eukaryotic Cell. In M. J. Carlile, J. F. Collins, and B. E. B. Moseley (ed.), Molecular and cellular aspects of microbial evolution. Cambridge University Press, Cambridge 33-84

Cavalier-Smith T., 1998. A Revised Six-Kingdom System of Life. Biol. Rev. 73, 203-266

Cavalier-Smith T., 1995. Evolutionary protistology comes of age: biodiversity and molecular biology. Arch Protistenkd 145, 145–154

Cavalier-Smith T., Chao EE., 1996. Molecular Phylogeny of the Free-Living Archezoan *Trepomonas agilis* and the Nature of the first Eukaryot. J. Mol. Evol. 43, 551-562

Cavalier-Smith T., 2002. The Phagotrophic Origin of Eukaryotes and Phylogenetic Classification of Protozoa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 297-354

Cavalier-Smith T., 2003. The Excavate Protozoan Phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, *Carpediemonas*, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their Evolutionary Affinities and New Higher Taxa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1741-1758

Cleveland LR., Hall SR., Sanders EP., Collier, J., 1934. The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its protozoa, and the symbiosis between protozoa and roach. Mem. Am. Acad. Arts Sci. (N. S.) 17, 185–342

Cleveland, LR., 1938. Longitudinal and transverse division in two closely related flagellates. Biol. Bull. 74, 1–40

Cleveland LR., 1950a. Hormone-induced sexual cycles of flagellates: II. Gametogenesis, fertilization, and one-division meiosis in *Oxymonas*. J Morphol 86, 185-214

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

- Cleveland LR., 1950c. Hormone-induced sexual cycles of flagellates: IV. Meiosis after syngamy and before nuclear fusion in *Notila*. J Morphol 87, 317-348
- Cleveland LR., 1956. Brief accounts of the sexual cycles of the flagellates of *Cryptocercus*. J Protozool 3, 161-180
- Cleveland LR., 1966. Nuclear division without cytokinesis followed by fusion of pronuclei in *Paranotila lata* gen. et sp. nov. J Protozool 13, 132-136
- Cleveland LR., Arthur W., Burke JR., Karlson P., 1960. Ecdysone Induced Modifications in the Sexual Cycles of the Protozoa of *Cryptocercus*. J Euk Microbiol 7, 229-239
- Cleveland LR., Hall SR., Sanders EP., Collier J., 1934. The wood-feeding roach *Cryptocercus*, its protozoa, and the symbiosis between protozoa and roach. Mem Am Acad Arts Sci 17, 185-342
- Cochrane SM., Smith HE., Buhse HE., Scammell JG., 1979. Structure of the attached stage of *Pyrronympha* in the termite *Reticulitermes flavipes* Kollar. Protistologica 15, 259-270
- Corliss JO., 1994. An interim utilitarian (users-friendly) hierarchical- classification and characterization of the protists. Acta Protozool 33, 1-51
- Cross JB., 1946. The flagellate subfamily oxymonadidae. Univ Cali Publ Zool 53, 67-162
- Dacks JB., Field MC., 2007. Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. J. of Cell Science 120, 2977-2985
- Dacks JB., Kuru T., Liapounova NA., Gedamu L., 2008. Phylogenetic and primary sequence characterization of cathepsin B cysteine proteases from the oxymonad flagellate *Monocercomonoides*. J Euk Microbiol. 55, 9-17
- Dacks JB., Roger AJ., 1999. The first sexual lineage and the relevance of facultative sex. J. Mol. Evol. 48, 779-783



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

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

Dexter-Dyer B., Khalsa O., 1993. Surface bacteria of *Streblomastix strix* are sensory symbionts. Biosystems 31, 169-180

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

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

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

\*Grassé PP., 1952. Traité de Zoologie 1, fasc. 1, Masson, Paris, 824-835

Grassé PP., 1956. L'ultrastructure de *Pyrsonympha vertens* (Zooflagellata Pyrsonymphina): les flagelles et leur coaptation avec le corps, l'axostyle contractile, le paraxostyle, le cytoplasme. Arch. Biol. 47, 595-611

Hall TA., 1999. BioEdit: a User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95-98

Hámpel V. Class Oxymonadea, Handbook of Protozoology, II. Edition (nepublikováno)

Hampl V., Horner DS., Dyal P., Kulda J., Flegr J., Foster PG., Embley TM., 2005. Inference of the Phylogenetic Position of Oxymonads Based on Nine Genes: Support for Metamonada and Excavata. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2508-2518

Hampl V., Simpson AGB., 2007. Possible Mitochondria-Related Organelles in Poorly-Studied „Amitochondriate“ Eukaryotes. In Tachezy J. (ed.): *Hydrogenosomes and Mitosomes: Mitochondria of Anaerobic Eukaryotes*, 265-279, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

Hampl V., Simpson AGB., 2008. Possible mitochondria-related organelles in poorly-studied 'amitochondriate' eukaryotes. *In Hydrogenosomes and Mitosomes of the Amitochondrial Protists* (Tachezy J, Ed.), *Series: Microbiology Monographs*, Springer, Heidelberg

Hampl V., Hug L., Leigh JW., Dacks JB., Franz Langf B., Simpson AGB., Roger AJ., 2009. Phylogenomic Analyses Support the Monophyly of Excavata and Resolve Relationships among Eukaryotic 'Supergroups'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3859-3864

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

Heiss AA., Keeling PJ., 2006. The phylogenetic position of the oxymonad *Saccinobaculus* based on SSU rRNA. *Protist* 157, 335-344

\*Helftenbein E., 1985. Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for alpha-tubulin from the ciliate *Stylonychia lemnae*. Special codon usage: TAA is not a translation termination codon. *Nucl. Acids Res.* 13, 415-433

Hollande A., Carruette-Valentin J., 1970a. Appariement chromosomique et complexes synaptonématiques dans les noyaux de dépolyploidisation chez *Pyrrsonympha flagellata*: le cycle évolutif des Pyrrsonymphines symbiotiques de *Reticulitermes lucifugus*. *C R Acad Sci, Paris, D* 270, 2250-2255

\*Hollande A., Carruette-Valentin J., 1970b. La lignée des Pyrsonymphines et les caractères infrastructuraux communs aux autres genres *Opisthomitus*, *Oxymonas*, *Saccinobaculus*, *Pyrsonympha* et *Streblomastix*. C R Acad Sci, Paris, D 270, 1587-1590

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

Honigberg BM., 1970. Protozoa associated with termites and their role in digestion. In : Krishna K, Weesner FM (eds) Biology of termites. Academic Press, New York 1–36

Honigberg BM., 1978. Trichomonads of veterinary importance. In: Kreier JP (ed) Parasitic protozoa, vol 2. Academic Press, New York 163–273

\*Horowitz H., Gorovsky MA., 1985. An unusual genetic code in nuclear genes of Tetrahymena. Proc. Natl Acad. Sci. USA 82, 2452-2455

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

Iida T., Ohkuma M., Ohtoko K., Kudo T., 2000. Symbiotic spirochetes in the termite hindgut: phylogenetic identification of ectosymbiotic spirochetes of oxymonad protists. Fems Microbiol Ecol 34, 17-26

Jensen EA., Hammond DM., 1964. A morphological study of trichomonads and related flagellates from the bovine digestive tract. J Protozool 11, 386-394

Kawaguchi Y., Honda H., Taniguchi-Morimura J., Iwasaki S., 1989. The codon CUG is read as serine in an asporogetic yeast *Candida cylindracea*. Nature 341, 164-166

Keeling PJ., Doolittle WF., 1996. Alpha-Tubulin from Early-Diverging Eukaryotic Lineages and the Evolution of the Tubulin Family. Mol. Biol. Evol. 13, 1297-1305

Keeling PJ., Doolittle WF., 1996a. A non-canonical genetic code in an early diverging eukaryotic lineage. *EMBO J.* 15, 2285-2290

Keeling PJ., Doolittle WF., 1997. Widespread code in diplomonads. *Mol. Biol. Evol.* 14, 895-901

Keeling PJ., Leander BS., 2003. Characterisation of a non-canonical genetic code in the oxymonad *Streblomastix strix*. *J Mol Biol* 326, 1337-1349

Kidder GW., 1929. *Streblomastix strix*, morphology and mitosis. *Univ Cali Publ Zool* 33, 109-124

Kirby HJ. 1934. Protozoa in termites. *In: Kofoid, C. A. (ed.), Termites and Termite Control.* University of California Press, Berkeley 84–93

Kirby H., Honigberg BM., 1949. Flagellates of the caecum of ground squirrels. *Univ Cali Publ Zool* 53, 315-366

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

Koidzumi M., 1921. Studies on the intestinal protozoa found in the termites of Japan. *Parasitology* 13, 235–309

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

Leander BS., Keeling PJ., 2003. Morphostasis in alveolate evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 395-402

Leander BS., Keeling PJ., 2004. Symbiotic innovation in the oxymonad *Streblomastix strix*. *J Euk Microbiol* 51, 291-300

\*Leidy J., 1877. On intestinal parasites of *Termes flaviceps*. Proc Natl Acad Sci, Philadelphia 146-149

Leidy J., 1881. The parasites of termites. J. Acad. Nat. Sci. Philadelphia (series 2), 8, 425–447

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

Li L, Frohlich J, Pfeiffer P, König H., 2003. Termite gut symbiotic Archaezoa are becoming living metabolic fossils. Eukaryot Cell 2, 1091-1098

Lozopune CA., Knight RD., Landweber LF., 2001. The molecular basis of nuclear genetic code change in ciliates. Curr. Biol. 11, 65-74

Maass A., Radek R., 2006. The gut flagellate community of the termite *Neotermes cubanus* with special reference to *Staurojoenina* and *Trichocovina hrnyi* nov. gen. nov. sp. Eur J Protistol 42, 125-141

Mackinnon DL., 1913b. Studies on parasitic Protozoa. II. (a) The encystment of *Rhizomastix gracilis* Alexeieff; (b) *Tetratrichomastix parisii* n. sub-gen., n. sp. Q J Microsc Sci 59, 459–470

\*McIntosh JR., 1973. Axostyle of *Saccinobaculus*. 2. Motion of microtubule bundle and a structural comparison of straight and bent axostyles. J Cell Biol 56, 324-339

\*McIntosh JR., Ogata ES., Landis SC., 1973. Axostyle of *Saccinobaculus*. 1. Structure of organism and its microtubule bundle. J Cell Biol 56, 304-323

Medlin L., Elwood HJ., Stickel S., Sogin ML., 1988. The Characterization of Enzymatically Amplified Eukaryotic 16S-Like rRNA-Coding Regions. Gene 71, 491-499

Meyer F., Schmidt HJ., Plumper E., Hasilik A., Mersmann G., Meyer HE. et al., 1991. UGA is translated as cysteine in pheromone 3 of *Euplotes octocarinatus*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88, 3758-3761

Moriya S., Dacks JB., Takagi A., Noda S., Ohkuma M., Doolittle WF., Kudo T., 2003. Molecular phylogeny of three oxymonad genera: *Pyrrsonympha*, *Dinenympha* and *Oxymonas*. J Euk Microbiol 50, 190-197

Moriya S., Ohkuma M., Kudo T., 1998. Phylogenetic position of symbiotic protist *Dinenympha* [correction of *Dinemympha*] *exilis* in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus* inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1 alpha. Gene 210, 221-227

Moriya S., Tanaka K., Ohkuma M., Sugano S., Kudo T., 2001. Diversification of the microtubule system in the early stage of eukaryote evolution: Elongation factor 1 alpha and alpha-tubulin protein phylogeny of termite symbiotic oxymonad and hypermastigote protists. J Mol Evol 52, 6-16

Moskowitz N., 1951. Observations on Some Intestinal Flagellates from Reptilian Host (Squamata). J. Morphol. 89, 257-321

Müller M., 1992. Energy metabolism of ancestral eukaryotes: a hypothesis based on the biochemistry of amitochondriate parasitic protists. Biosystems 28, 33-40

Nie D., 1950. Morphology and Taxonomy of the Intestinal Protozoa of the Guinea-pig, *Cavia porcella*. J. Morphol. 86, 381-493

Noda S., Inoue T., Hongoh Y., Kawai M., Nalepa CA., Vongkaluang C., Kudo T., Ohkuma M., 2006. Identification and characterization of ectosymbionts of distinct lineages in *Bacteroidales* attached to flagellated protists in the gut of termites and a wood-feeding cockroach. Environ Microbiol 8, 11-20

Noda S., Ohkuma M., Yamada A., Hongoh Y., Kudo T., 2003. Phylogenetic position and in situ identification of ectosymbiotic spirochetes on protists in the termite gut. *Appl Environ Microbiol* 69, 625-633

O'Kelly CJ., 1993. The jakobid flagellates: structural features of *Jakoba*, *Recliizomoiias* and *Histionu* and implications for the early diversification of eukaryotes. *J. Eukavot. Microbiol.* 40, 627436

O'Kelly CJ., Farmer MA., Nerad TA., 1999. Ultrastructure of *Trimastix pyriformis* (Klebs) Bernard et al similarities of *Trimuvtix* species with retortarnonad and jakobid flagellates. *Protist* 150, 149-162

Odelson DA., Breznak JA., 1985. Nutrition and growth characteristics of *Trichomitopsis termopsidis*, a cellulolytic protozoan from termites. *Appl Environ Microbiol* 49, 614–21

Osawa S., Jukes TH., 1989. Codon reassignment (codon capture) in evolution. *J. Mol. Evol* 28, 271-278

Osawa S., Jukes TH., Watanabe K., Muto A., 1992. Recent evidence for evolution of the generic code. *Microbiol. Rev.* 56, 40,9-4045

Patterson DJ., 1994. Protozoa: Evolution and Systematics. *In:* Hausmann, K. & Hulsmann, N. (ed.), *Progress in Protistology*. Gustav Fischer Verlag, Berlin. 1-14

Radek R., 1994. *Monocercomonoides termitis* n. sp, an Oxymonad from the lower termite *Kaloterme sinaicus*. *Arch Protistenkd* 144, 373-382

Radek R., 1999. Flagellates, bacteria, and fungi associated with termites: diversity and function in nutrition - a review. *Ecotropica* 5, 183-196

\*Reeves RE., Warren LG., Susskind B., Loi HS., 1977. Energy conserving pyruvate to acetate pathway in *Entamoeba histolytica* - pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J Biol Chem* 252, 726-731

Rother A., Radek R., Hausmann K., 1999. Characterization of surface structures covering termite flagellates of the family oxymonadidae and ultrastructure of two oxymonad species, *Microrhopalodina multinucleata* and *Oxymonas* sp. Eur J Protistol 35, 1-16

Rozario C., Morin L., Roger AJ., Smith MW., Müller M., 1996 Primary structure and phylogenetic relationship of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes of tree-living and parasitic diplomonad flagellates. J. Eukaryot. Microbiol. 43, 330-340

Shimodaira H., Hasegawa G., 2001. CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. Bioinformatics 17, 1246–1247

Shimodaira H., 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. Syst. Biol. 51,492–508

\*Schneider SU., Leible MB., Yang, XP., 1989. Strong homology between the small subunit of ribose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase of two species of *Acetabularia* and the occurrence of unusual codon usage. Mol. Gen. Genet. 218, 445-452

Schultz DW., Yarus M., 1996. On malleability in the genetic code. J. Mol. Evol. 42, 597-601

Schultz DW., Yarus M., Transfer RNA., 1994 Mutation and the malleability of the genetic code. J. Mol. Biol. 235, 1377-1380

Simpson AGB., Bernard C., Patterson DJ., 2000. The ultrastructure of *Trimastix marina* Kent, 1880 (Eukaryota), an excavate flagellate. Eur J. Protistol. 36, 229-252

Simpson AGB., 2003. Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1759-1777

Simpson AGB., Inagaki Y., Roger AJ., 2006. Multigene Phylogenies of Excavate Protists Reveal the Evolutionary Positions of "Primitive" Eukaryotes. Mol. Biol. Evol. 23, 615-625



Simpson AGB., Radek R., Dacks JB., O'Kelly CJ., 2002b. How Oxymonads Lost Their Groove: An Ultrastructural Comparison of *Monocercomonoides* and Excavate Taxa. J. Eukaryot. Microbiol. 49, 239-248

Simpson AGB., Roger AJ., Silberman JD., Leipe DD., Edgcomb VP., Jermin LS., Patterson DJ., Sogin ML., 2002a. Evolutionary History of "Early-Diverging" Eukaryotes: The Excavate Taxon *Carpodiomonas* is a Close Relative of *Giardia*. Mol. Biol. Evol. 19, 1782-1791

Slamovits CH., Keeling PJ., 2006b. Pyruvate-phosphate dikinase of oxymonads and parabasalids and the evolution of pyrophosphate-dependent glycolysis in anaerobic eukaryotes. Euk Cell 5, 148-154

Slamovits CH., Keeling PJ., 2006a. A high density of ancient spliceosomal introns in oxymonad excavates. BMC Evol Biol 6, 34

Smejkalová P., 2010. Evoluce skupiny Retortamonadida. Diplomová práce. Katedra parazitologie, PřF UK

\*Smith HS., Arnott HJ., 1973. Scales associated with external surface of *Pyrrsonympha vertens*. Trans Amer Micros Soc 92, 670-677

\*Smith HE., Arnott HJ., 1974. Axostyle structure in termite protozoan *Pyrrsonympha vertens*. Tissue & Cell 6, 193-207

Smith HE., Stamler SJ., Buhse Jr., 1975. A scanning electron microscope survey of the surface features of polymastigote flagellates from *Reticulitermes flavipes*. Trans. Amer. Micros. Soc. 94, 401-410

Stingl U., Brune A., 2003. Phylogenetic diversity and whole-cell hybridization of oxymonad flagellates from the hindgut of the wood-feeding lower termite *Reticulitermes flavipes*. Protist 154, 147-155

Stingl U., Radek R., Yang H., Brune A., 2005. "Endomicrobia": Cytoplasmic symbionts of termite gut protozoa form a separate phylum of prokaryotes. *Appl Environ Microbiol* 71, 1473-1479

Swofford DL., 1998. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Thompson JD., Gibson TJ., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins DG., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876–4882

Travis BV., 1932. A discussion of synonymy in the nomenclature of certain insect flagellates, with the description of a new flagellate from the larvae of *Ligyrodes relictus* Say (Coleoptera-Scarabeidae). *Iowa State Coll J Sci* 6, 317–323

Urcroft J., Urcroft P., 1998. My favorite cell: *Giardia*. *Bioessays* 20, 256-263

Wenzel M., Schonig I., Berchtold M., Kampfer M., König H., 2002 Aerobic and facultative anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *J Appl Microbiol* 92, 32–40

Yamao F., Muto A., Kawauchi Y., Iwami M., Iwagami S., Azumi Y., Osawa S., 1985. UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 2306–2309.

Yamin MA., 1978. Axenic cultivation of the cellulolytic flagellate *Trichomitopsis termopsidis* (Cleveland) from the termite *Zootermopsis*. *J Protozool* 25, 535–538

\*Yamin MA., 1979. Flagellates of the orders Trichomonadida Kirby, Oxymonadida Grassé, and Hypermastigida Grassi & Foa reported from lower termites (Isoptera families Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, and Serritermitidae) and from the wood-feeding roach *Cryptocercus* (Dictyoptera: Cryptocercidae). *Sociobiology* 4, 5–119

\*Yamin M.A., 1981. Cellulose metabolism by the flagellate *Trichonympha* from a termite is independent of endosymbiotic bacteria. *Science* 211, 58-59

Yang H., Schmitt-Wagner D., Stingl U., Brune A., 2005. Niche heterogeneity determines bacterial community structure in the termite gut (*Reticulitermes santonensis*). *Environ Microbiol* 7, 916-932

Yang H., Wei HL., Huang BA., Baum YX., Hu GW., Kattawar MI., Mishchenko, Fu Q., 2005. Scattering and absorption property database for nonspherical ice particles in the near- through far-infrared spectral region. *Appl. Opt.* 44, 5512-5523