

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Fylogeneze améb čeledi Flabellulidae**

Bakalářská práce

**Martina Jedličková**

Školitel: Mgr. Martin Kostka, Ph.D.

České Budějovice 2015

Jedličková, M. (2015): Fylogeneze améb čeledi Flabellulidae. [Phylogeny of amoebae of family Flabellulidae. Bc. Thesis, in Czech.] – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This thesis deals with one of little groups of amoeboid protozoa – family Flabellulidae of Amoebozoa group (Lobosa, Tubulinea). This group has only one cell with one or many nuclei. Body is not covered by shell or scales, but only with glycocalyx. They move by using lobopodias, the movement being based on actin-myosin complex. Family Flabellulidae includes currently the genera *Flabellula* and *Paraflabellula*, historically genus *Flamella*. We lack sufficient information about phylogeny of family Flabellulidae. New sequences of aktin genes, SSU rRNA and COX1 from members of family Flabellulidae were obtained in this study and the relationships between family Flabellulidae and other hierarchical groups are also discussed.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 21. 4. 2015

Martina Jedličková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Martinu Kostkovi, Ph.D. za odborné vedení a pomoc s touto bakalářskou prací, za cenné rady, věcné připomínky, trpělivost a velmi přátelský přístup.

Touto cestou bych také ráda poděkovala celé Laboratoři rybí protistologie Parazitologického ústavu AV ČR za vlídné prostředí, poskytnutí vzorků i sekvencí, cenné rady a pomoc při zvládnání jednotlivých molekulárních metod, a zvláště RNDr. Tomáši Tymlovi za poskytnuté vzorky izolované DNA.

Další velké poděkování patří Aleši Lisnerovi za pomoc s korekturou a podporu; a hlavně mé rodině za umožnění studia a za podporu při studiu a vzniku této bakalářské práce.

## Obsah

1 Cíle práce.....	1
2 Úvod.....	2
3 Teoretická část bakalářské práce.....	3
3.1 Zařazení čeledi Flabellulidae do širšího fylogenetického kontextu.....	3
3.1.1 Amoebozoa.....	3
3.1.1.1 Lobosa.....	4
3.1.1.1.1 Tubulinea.....	5
3.2 Užší zařazení čeledi Flabellulidae – řád Leptomyxida.....	7
3.2.1 Leptomyxidae.....	8
3.2.2 Flabellulidae Bovee, 1970.....	10
3.2.2.1 Životní cyklus Flabellulideae.....	10
3.2.2.2 Morfotyp.....	12
3.2.2.3 Morfologie Flabellulideae.....	14
3.2.2.4 Příjem potravy.....	15
3.2.2.5 „Flabellulí“ pohyb.....	16
3.2.2.6 Vnitřní fylogeneze Flabellulidae.....	16
3.2.2.6.1 Historie objevení a zařazení skupiny.....	16
3.2.2.6.2 Rod <i>Flabellula</i> .....	17
3.2.2.6.3 Rod <i>Paraflabellula</i> .....	19
3.2.2.6.4 Další organismy řazené do skupiny Flabellulidae.....	20
4 Praktická část bakalářské práce.....	22
4.1 Hypotézy.....	22
4.2 Materiál.....	22
4.3 Metody.....	24
4.3.1 Amplifikace vybraných proteinů – pomocí PCR.....	24
4.3.1.1 Gen pro SSU rRNA.....	25
4.3.1.2 Gen pro aktin.....	26
4.3.1.3 Gen pro $\alpha$ -tubulin.....	27

4.3.1.4 Mitochondriální gen pro COX1 .....	27
4.3.1.5 Chaperon Hsp90 .....	27
4.3.1.6 Elongační faktor-1 $\alpha$ .....	28
4.3.2 Elektroforéza .....	28
4.3.3 Extrakce DNA z gelu .....	29
4.3.4 Klonování .....	29
4.3.4.1 Ligace a transformace kompetentních buněk .....	29
4.3.4.2 PCR Screening .....	30
4.3.4.3 Namnožení plazmidu .....	31
4.3.5 Sekvence .....	31
4.3.6 Zpracování sekvenčních dat, fylogenetické analýzy .....	31
4.4 Výsledky .....	32
4.4.1 Gelová elektroforéza a PCR .....	32
4.4.2 Sekvence .....	33
4.4.3 Fylogenetická analýza .....	34
5 Diskuze .....	41
5.1 Použité primery .....	41
5.2 Fylogenetická analýza genu pro SSU rRNA .....	42
5.3 Fylogenetická analýza genu pro aktin .....	44
5.4 Fylogenetická analýza genu pro $\alpha$ -tubulin .....	45
5.5 Fylogenetická analýza - konkaténát .....	46
5.6 Fylogenetická analýza založená na genech pro COX1 .....	46
5.7 „Rody“ studované skupiny Flabellulidae .....	46
6 Závěr .....	49
7 Zkratky .....	50
8 Zdroje .....	51

## **1 Cíle práce**

Cílem této bakalářské práce bylo:

- vypracovat rešerši k danému tématu včetně zasazení skupiny Flabellulidae do širšího fylogenetického kontextu
- získat sekvenční data různých linií flabellulidních améb
- fylogenetická analýza získaných dat
- interpretovat výsledky

## 2 Úvod

Fylogenetická analýza se snaží zařadit jednotlivé druhy, rody a další taxonomická uskupení do širšího kontextu příbuznosti. Pokouší se o zjištění evolučního původu a společného předka na základě podobnosti. Tyto vztahy mezi jednotlivými skupinami zkoumá taxonomie, která každé z nich dává určitou hierarchickou úroveň. Od přesného členění do jednotlivých úrovní (např. řádů či kmenů) se v pojetí dnešní moderní taxonomie postupně upouští. Jednotlivé skupiny sice mají hierarchii, ale není přesně stanoveno, která úroveň je jaká taxonomická jednotka (např. Adl *et al.*, 2005).

Čeď Flabellulidae spadající do skupiny Amoebozoa zahrnuje améby se zploštělou buňkou bez skořápky, které se pohybují pomocí panožek. Často mají větší množství jader. Zástupci této čeledi žijí ve vlhkém prostředí, jak ve slané, tak ve sladké vodě. Jejich životní cyklus zahrnuje pouze trofozoity, cysty pravděpodobně netvoří. Jedna z prvních fylogenetických analýz sekvencí SSU rDNA této skupiny (Dyková *et al.*, 2008a) zařadila čeď Flabellulidae do skupiny Leptomyxida do příbuznosti k rodu *Rhizamoeba*. Následně (Kostka *et al.*, 2013) však byly získány další sekvence SSU rDNA. Tyto sekvence vytvářejí v představách o fylogenezi této skupiny nejasnosti. Vznikají dvě skupiny flabellul, každá se ve fylogenetické analýze zařazuje jinam – jedna spadá do čeledi Flabellulidae, druhá skupina flabellul k rodům *Amoeba* a *Chaos*, tedy zcela jinam než se původně předpokládalo. Tento fakt by pak znamenal, že celá studovaná skupina je polyfyletická. Dále byly získány sekvence aktinu, které tyto dvě skupiny opět řadí do skupiny Leptomyxida (Kostka *et al.*, 2013). Nově získané sekvence dalších genů by mohly vnést více jasnosti do problému fylogenetických vztahů studované čeledi (Kostka *et al.*, 2013). Momentálně jsou do skupiny řazeny rody *Flabellula* a *Paraflabellula* s nejznámějšími zástupci *Flabellula trinovantica* a *Flabellula citata* (Page, 1983).

Teoretická část bakalářské práce rozebírá zasazení těchto rodů a čeledi do širšího fylogenetického kontextu, shrnuje základní informace k dané problematice a dále se zabývá také morfologií, ekologií a fyziologií zástupců čeledi.

Část praktická se zabývá procesem získávání sekvencí různých genů jednotlivých druhů (kmenů) čeledi Flabellulidae. Často bývá z druhu (kmenu) k dispozici pouze sekvence genu pro SSU rRNA, popř. aktin, ale to mnohdy nepostačuje pro úplné pochopení postavení v rámci skupiny a nedává jasnou představu o fylogenezi. Práce pojednává o získávání a získání dalších sekvencí v rámci skupiny Flabellulidae, snaží se doplnit v některých případech sekvenci SSU rDNA, osvětlit bližší fylogenetické vztahy v rámci této skupiny a předkládá možnosti dalšího výzkumu.

### 3 Teoretická část bakalářské práce

#### 3.1 Zařazení čeledi Flabellulidae do širšího fylogenetického kontextu

Představy o fylogenezi améb na základě molekulárních dat jsou poměrně nestálé. Níže (Obr. 1) je uvedeno fylogenetické zařazení čeledi Flabellulidae, sestaveno podle mnoha zdrojů např. Cavalier-Smith (2010, 2013); Cavalier-Smith *et al.* (2015), do úrovně kmenu. Tuto fylogenezi podporují i další studie (např. Lahr *et al.*, 2011b; Smirnov *et al.*, 2011).

**(kmen): Amoebozoa**  
**(podkmen): Lobosa**  
**(třída): Tubulinea**  
**(řád): Leptomyxida**  
**čeleď: Flabellulidae**

Obr. 1: Zařazení čeledi Flabellulidae do širšího fylogenetického kontextu (z mnoha zdrojů např. Cavalier-Smith, 2010; 2013; Lahr *et al.*, 2011b nebo Smirnov *et al.*, 2011).

##### 3.1.1 Amoebozoa

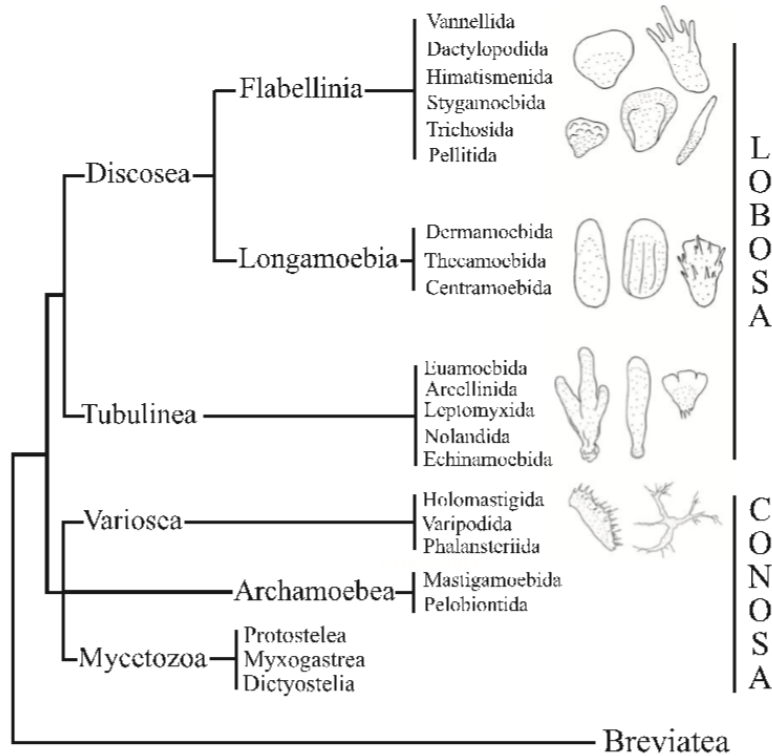
Flabellulidae patří mezi zástupce skupiny Amoebozoa, kteří tvoří panožky různých typů (nejčastěji lobopodie, vzácněji filopodie). Panožky jsou výčnělky cytoplazmy (Hausman & Hülsman, 2003) a slouží zejména k pohybu a získávání potravy. Améby ze skupiny Amoebozoa často nemají žádné jiné speciální diferencované pohybové aparáty jako bičíky nebo brvy. Jsou tvořeny jednou buňkou, která může a nemusí mít schránku. Někdy mohou tvořit mnohobuněčné útvary. Tělo se během pohybu stále mění (polymorfismus). Kvůli jejich polymorfismu je velice složité nacházet morfologické znaky, pomocí kterých by šlo spolehlivě určit, do kterého taxonu patří (Smirnov *et al.*, 2011). Buňka obsahuje jedno nebo více jader (např. Dyková *et al.*, 2008a; Hausman & Hülsman, 2003).

Pravých améb (skupina Amoebozoa) je momentálně popsáno okolo 2400 druhů (Pawlowski *et al.*, 2012). Tyto organismy jsou téměř všudypřítomné, nejčastěji se vyskytují ve vodě či ve vlhkém prostředí, některé z nich žijí parazitickým způsobem života. Nemoci způsobované amébami mohou být i pro člověka velmi nebezpečné: způsobují akantamébovou keratitidu (rod *Acanthamoeba*), granulomatozní amébovou encefalitidu (rody *Acanthamoeba* a *Balamuthia*) nebo měňavkovou úplavici (*Entamoeba histolytica*) (Hausman & Hülsman, 2003).

Monofylie celé skupiny je často diskutována. Byla napadána zejména kvůli malému množství synapomorfí, tedy morfologicky ojedinělých, ale společných znaků. Nejnovější



studie (Cavalier-Smith *et al.*, 2015) se přiklání k monofylii celé skupiny. Skupinu tradičně členíme na dva „podkmeny“: Lobosa a Conosa (Obr. 2). Lobosa nemají nikdy žádný bičík ani cílie (Smirnov *et al.*, 2011).



Obr. 2: Fylogeneze Amoebozoa (Smirnov *et al.*, 2011).

Do skupiny Conosa jsou řazeny améboidní linie, u kterých se mohou ancestrálně vyskytovat bičíky (Cavalier-Smith & Chao, 1998; Cavalier-Smith *et al.*, 2015) a také konická mikrotubulární kostra (Cavalier-Smith, 2004). Patří sem zástupci jak aerobní (Mycetozoa), tak anaerobní, ale i druhy známé svými parazitickými sklony (Archamoebae), např. měňavka úplavičná (*Entamoeba histolytica*) (Volf & Horák, 2007). Představy o fylogenezi této skupiny jsou nestabilní a poměrně často se mění. Nejnovější analýza Cavaliera-Smitha a kolektivu (2015) se přiklání k monofylii.

### 3.1.1.1 Lobosa

Skupina Lobosa zahrnuje zejména volně žijící améby. Zástupci této skupiny netvoří bičíky v žádném stádiu (Volf & Horák, 2007). Některé druhy jsou nahé pouze s cytoplazmatickou membránou a glykokalyxem na povrchu, jiné pak tvoří různé typy schránek, popřípadě mají šupiny.

Jejich životní cyklus je většinou jednoduchý, vyskytují se nejčastěji dvě stádia – vlastní volně se pohybující jedinec (trofozoit) a cysta. Ne všechny druhy a skupiny ovšem cysty tvoří. Jde pravděpodobně o asexuální organismy (Smirnov & Goodkov, 1999; Smirnov *et al.*, 2005).

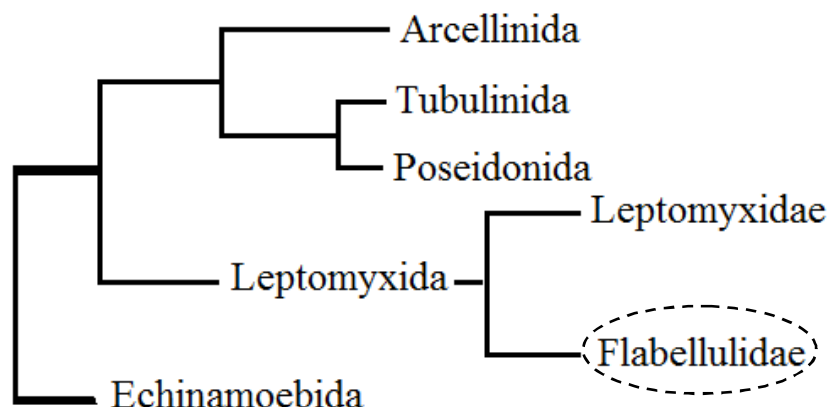
Nejnovější fylogenetické analýzy podporují monofylii této skupiny (Cavalier-Smith *et al.*, 2015), některé starší studie i polyfylii (Fahrni *et al.*, 2003). Další fylogenetické analýzy se skupinou Lobosa (Lobosea) vůbec nepracují (např. Smirnov *et al.*, 2005). Mezi Lobosa jsou řazeny skupiny Tubulinea a Discosea (např. Smirnov *et al.*, 2011).

Skupina Discosea je určena molekulárně. Jedním z mála morfologických znaků je velmi zploštělé tělo během pohybu améby; cytoplazma proudí polyaxiálně (v několika paralelních proudech) (Smirnov *et al.*, 2005).

#### **3.1.1.1.1 Tubulinea**

Fylogeneticky je čeleď Flabellulidae řazena mezi Tubulinea, což je stabilní monofyletický taxon v kmeni Amoebozoa (Lahr *et al.*, 2011a; Lahr *et al.*, 2011b; Smirnov *et al.*, 2005). Do této skupiny patří i známé druhy rodu *Amoeba* nebo *Arcella*. Morfologicky se pak vyznačují zejména cylindrickými pseudopodiemi, ve kterých cytoplazma proudí monoaxiálně (v jednom proudu), cytoplazma proudí monoaxiálně často v celé buňce. Některé rody produkují několik pseudopodií válcovitého tvaru (rod *Amoeba*), další rody vytvářejí pouze jednu subcylindrickou pseudopodii, která zahrnuje v podstatě celé tělo. Jejich tělo je nahé (některé druhy mají skořápku nebo šupiny) a pohybují se pomocí aktinomyosinového komplexu. Nemají příliš mnoho synapomorfí, jednotlivé druhy jsou značně rozdílné. Spojují je hlavně molekulární data (Smirnov *et al.*, 2005). Fylogenetické analýzy spoléhaly zejména na sekvence genu pro SSU rRNA, ty se zdají mít zdaleka nejlepší sampling, ale dnes jsou často tyto analýzy také doplňovány sekvencemi aktinu a dalších proteinů (Lahr *et al.*, 2011a; Lahr *et al.*, 2011b; Lahr *et al.*, 2013).

Vnitřní uspořádání skupiny Tubulinea prodělalo během posledního desetiletí poměrně velké změny. V současné době se dělí do šesti hlavních skupin, které jsou molekulárně dobře odlišeny: Amoebidae, Hartmannellidae (spojovány do skupiny Tubulinida), Echinamoeboida, Leptomyxida, Poseidonida a problematické Arcellinida (Obr. 3) (Lahr *et al.*, 2011). Lahr *et al.* (2013) potvrzují monofylii 4 ze 6 hlavních skupin – Echinamoeboida, Leptomyxida, Amoebidae a Poseidonida.



Obr. 3: Vnitřní fylogeneze skupiny Tubulinea vytvořena podle zdroje Lahr *et al.* (2011a).

Hartmannellidae jsou skupinou malých améb (30-40  $\mu\text{m}$ ), jejíž monofylie není podpořena (Lahr *et al.*, 2013). Podle některých fylogenetických analýz se nezdá být monofyletická z důvodu obsažení rodu *Saccamoeba*, který často v analýzách vybočuje (Bolivar *et al.*, 2001; Cavalier-Smith, 2004; Lahr *et al.*, 2013; Pawlowski & Burki, 2009 nebo Smirnov *et al.*, 2005). Pokud by byl tento rod vyčleněn, pak by skupina mohla být opravdu monofyletická. Nejnovější studie vyčleňuje některé druhy tohoto rodu a přejmenovává je na rod *Ptolemeba* (Watson *et al.*, 2014). To ještě z čeledi Hartmannellidae monofyletickou skupinu nedělá, bylo by třeba rod *Ptolemeba* formálně zařadit do samostatné čeledi, ale tento fakt je prozatím v literatuře opomíjen. V tradičním pojetí skupina zahrnuje zejména rody *Cashia*, *Glaeseria*, *Hartmannella* a problematický rod *Saccamoeba*. Překvapivě se ukázalo, že do této skupiny patří i rody *Copromyxa* a *Copromyxella*. (Brown *et al.*, 2011).

Skupina Amoebidae, která je často přiřazována ke skupině Hartmannellidae, nese velmi vysokou podporu monofylie (bootstrapová hodnota – 100 %) (Lahr *et al.*, 2013). K Amoebidae, amébám s velmi proměnlivým tvarem těla, jsou řazeny rody *Amoeba*, *Chaos*, *Polychaos*, *Parachaos*, *Trichamoeba*, *Deuteramoeba* a *Hydramoeba* (např. Lahr *et al.*, 2013).

Arcellinida je druhově bohaté uskupení s častým zastoupením ve vodním prostředí. Mají schopnost produkovat „skořápky“ – proto jsou označovány jako skořepaté améby (Lahr *et al.*, 2013). „Skořápky“ jsou velmi důležité struktury, které taxonomicky vymezují jednotlivé druhy. Arcellinida se žíví malými houbami, řasami a převážně bakteriemi (Nikolaev *et al.*, 2005). S rodem *Acella* se lze běžně setkat v organicky znečištěných vodách, např. v hloubkách rybníků, kde není velké množství kyslíku (Smirnov *et al.*, 2005).

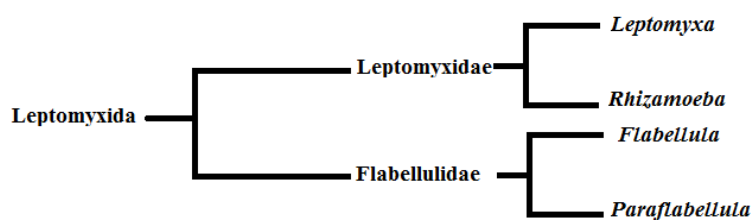
Představy o jejich fylogenezi nejsou zcela objasněny. Jde o skupinu, která buď v dané rekonstrukci není monofyletická, nebo má velmi nízkou až střední hladinu podpory monofylie. Také se diskutuje o tom, že by se mohlo jednat o nepřirozeně vytvořený taxon, kde schránky vznikly opakovaně na základě konvergence (Lahr *et al.*, 2013). Monofyletické nejsou ani některé rody v rámci této skupiny např. *Heleopera*, *Hyalosphenia* nebo *Nebela* (Lahr *et al.*, 2011a; Lara *et al.*, 2008). Monofylie skupiny Arcellinida je sice podpořena fylogenetickými analýzami, které vytvořil např. Nikolaev *et al.* (2005) a Lara *et al.* (2008), ale nelze přesně stanovit taxonimickou stabilitu z důvodů velké rozmanitosti těchto skořepatých améb, většina studií neobsahuje tak velké množství vzorků, aby pokryly celkovou diverzitu této skupiny.

Poseidonida Lahr *et al.*, 2013 se velikostně pohybují v rozmezí 5–20  $\mu\text{m}$ . Průřez pseudopodií je kruhový nebo eliptický. Tato skupina byla nově nazvána – v jiných pracech nazývána Nolandida (např. Smirnov *et al.*, 2011). Jejich monofylie byla plně podpořena (Lahr *et al.*, 2013).

Skupina Echinamoeboida je podle nynějších fylogenetických rekonstrukcí monofyletická. Obsahuje rody *Echinamoeba* a *Vermamoeba* (Lahr *et al.*, 2013) (dříve *Hartmanella vermiformes*) (např. Baumgartner *et al.*, 2003) a nově také velmi malé améby rodu *Micriamoeba* (Atlan *et al.*, 2012). Rod *Echinamoeba* zahrnuje malé, nahé améby s jedním jádrem (Baumgartner *et al.*, 2003). *Vermamoeba vermiformes* je poměrně běžná améba žijící ve vodním prostředí, podle dostupné literatury může sloužit také jako rezervoár šíření bakterií např. rodu *Legionella* (Fouque *et al.*, 2014).

### **3.2 Užší zařazení čeledi Flabellulidae – řád Leptomyxida**

Řád Leptomyxida je, dle dat publikovaných v literatuře, monofyletický (Lahr *et al.*, 2013), ale část jeho předpokládaných zástupců má aberantní sekvence SSU rDNA naznačující i možnou polyfylii (Kostka *et al.*, 2013). Obsahuje pro tuto práci důležitou čeleď Flabellulidae s rody *Flabellula* a *Paraflabellula* (např. Dyková *et al.*, 2008a; Page, 1983), dále do této skupiny spadá čeleď Leptomyxidae s rody *Rhizamoeba* a *Leptomyxa* (Obr. 4) (např. Lahr *et al.*, 2013; Page, 1983).



Obr. 4: Hierarchické členění skupiny Leptomyxida; dnes uznávané rody a čeledi (dle různých zdrojů, zejména: Dyková *et al.*, 2008a; Page, 1983 Tekle *et al.*, 2008).

Pohyblivé formy řádu Leptomyxida mají obecně zploštělý tvar buňky. Povrch buňky není kryt skořápkou nebo šupinami, ale pouze velmi tenkým a poměrně amorfním glykokalyxem. Jejich cysty jsou běžného kulovitěho tvaru bez pórů s dvojitou stěnou; nebo se vůbec nevyskytují (Smirnov *et al.*, 2005), u čeledi Flabellulidae zaznamenány pouze u druhu *Paraflabellula hoguae* (Singh & Hanumaiah, 1979) a *Flabellula patuxent* (Bovee & Sawyer, 1979). Vyskytují se jednojaderné formy, v některých případech i vícejaderné (Dyková *et al.*, 2008a; Smirnov *et al.*, 2005).

### 3.2.1 Leptomyxidae

Čeď Leptomyxidae zahrnuje améby se zploštělým tělem, jednojaderné i vícejaderné, které se pohybují pomalu (Smirnov *et al.*, 2005). Monofylie skupiny není podpořena, v některých analýzách se v sesterské pozici vyskytuje rod *Rhizamoeba* a *Paraflabellula* (Dyková *et al.*, 2008a; Tekle *et al.*, 2008). Morfologicky jsou do čeledi Leptomyxidae řazeny rody *Rhizamoeba* a *Leptomyxa*, dříve také *Ripidomyxa*.

#### Rod *Rhizamoeba*

Je pravděpodobné, že tento rod je polyfyletický nebo je problém s morfologickým určením. Ve fylogenetickém stromě netvoří jednu linii (Smirnov *et al.*, 2009; Dyková *et al.*, 2008a). Buňky améb tohoto rodu jsou jednojaderné nebo vícejaderné s centrálním malým jádrem. V cytoplazmě se neobjevují žádné krystalky. Glykokalyx je buď velmi tenký, nebo nebyl vůbec zjištěn (Page, 1983). Rozmnožují se nepohlavně, prostým dělením. Uroid je adhezivní ve všech případech (Page, 1972).

*Rhizamoeba neglecta* Smirnov *et al.*, 2009 je druh, který byl popsán poměrně nedávno (2009), délka buňky se pohybuje mezi 70–140  $\mu\text{m}$ . Tato améba má kyjovitý tvar těla, jádro je pak podlouhlé a zploštělé. V jádře byl objeven systém jemných kanálků, které jsou viditelné v elektronovém mikroskopu. Vyskytuje se ve sladké, často stojaté vodě,

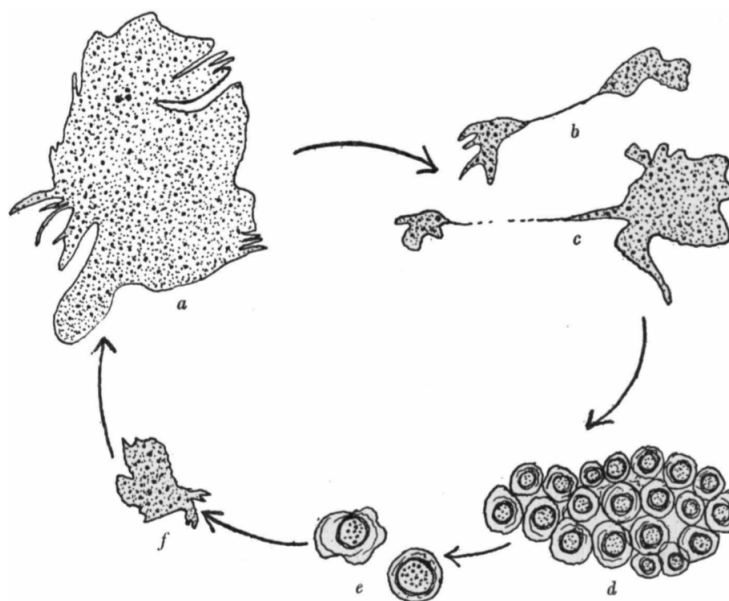
typicky např. jezera (Smirnov *et al.*, 2009).

*Rhizamoeba polyura* Page, 1972 je aktivně žijící druh polokulovitého, podlouhlého nebo kapkovitého tvaru s tupě ukončenou přední částí. Většina buněk má pouze jedno jádro, ale existují i jedinci s více jádry. Jadérko i jaderná membrána se rozpadají v průběhu mitózy. Tento druh nevytváří žádné kontraktilní vakuoly (Page, 1972).

Dalším známým druhem je např. *Rhizamoeba saxonica* Page, 1974 (Smirnov *et al.*, 2009).

### Rod *Leptomyxa*

*Leptomyxa reticulata* Goodey, 1914 je améba s více jádry (Singh, 1948). Běžně se vyskytuje v půdě (Singh, 1945). U tohoto druhu je velmi dobře popsán životní cyklus, který obsahuje lezoucí formy (trofozoity), které se pomocí nepohlavního dělení rozmnožují, a vznikají vícejaderné shluky cyst. Z každé cysty vzniká nový jedinec (Obr. 5) (Singh, 1948).



Obr. 5: Schematicky znázorněný životní cyklus druhu *Leptomyxa reticulata*. a – dospělý jedinec; b, c – nepohlavní dělení buňky; d – shluk multinukleárních cysty formujících se z jednoho jedince; e – dvě multinukleární cysty; f – malý nově vznikající jedinec (z cysty) (Singh, 1948).

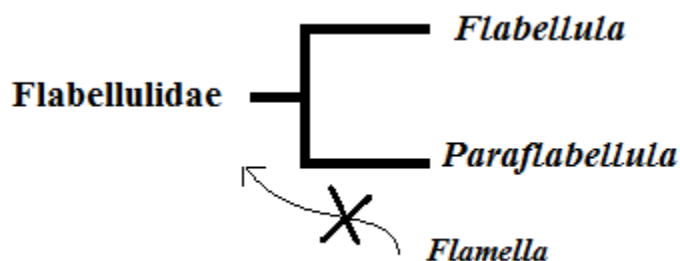
### Rod *Ripidomyxa*

Dříve se řadil do skupiny Leptomyxidae také rod *Ripidomyxa* – konkrétně byl vytvořen pro druh *Ripidomyxa australiensis* (Chakraborty & Pussard, 1985), později na

základě morfologie tento druh Page (1988) převedl do rodu *Rhizamoeba*. Rod byl monotypický pouze s druhem *Ripidomyxa australiensis*, takže by neměl být dále využíván. V databázi NCBI se nachází dvě částečné sekvence genu pro 18S rRNA přiřazené k rodu *Ripidomyxa* (3. 4. 2015) – tato data nebyla publikována, pocházejí z Ph.D. práce a k dispozici jsou dvě fotografie organismu, který morfologicky vypadá jako rod *Rhizamoeba*, ale není vyloučeno, že s přibývajícimi daty bude v budoucnu rod *Rhizamoeba* rozdělen na více rodů (Smirnov *et al.*, 2008).

### 3.2.2 Flabellulidae Bovee, 1970

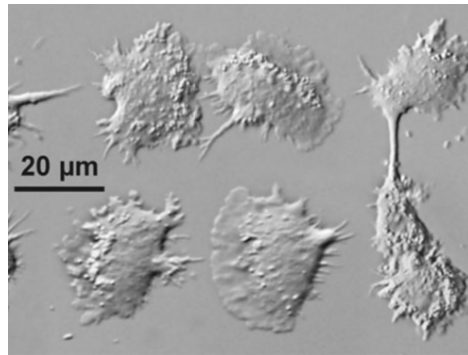
Flabellulidi jsou améby, které netvoří žádné schránky. Jejich tělo je zploštělé, glykokalyx (polysacharidový obal buňky) je výrazně ztenčený, někdy však zřetelný (Page, 1983). V jejich buňce se objevuje větší množství jader. Vyskytují se ve vodním prostředí, často ve sladké, ale i ve slané vodě. Pravděpodobně mohou být parazité až komenzálové ryb a bezobratlých (Bovee & Sawyer, 1979; Dyková *et al.*, 2008a). Představy o fylogenezi nejsou zcela jasné, dnes je čeleď členěna do dvou rodů *Paraflabellula* a *Flabellula*, historicky pak byl přiřazován rod *Flamella* (Obr. 6).



Obr. 6: Rody čeledi Flabellulidae: *Flabellula* a *Paraflabellula*; historicky *Flamella*.

#### 3.2.2.1 Životní cyklus Flabellulidae

Životní cyklus flabellul a paraflabellul není příliš dobře prozkoumán, mnohé základní informace nejsou známy. Životní cyklus by měl zahrnovat maximálně dvě základní formy: trofozoity – aktivní formy (Obr. 7) a cysty – odolná stádia. Plovoucí formy jsou běžně k vidění, ale cysty podle dostupné literatury byly pozorovány pouze u druhu *Paraflabellula kudoii* (Singh & Hanumaiah, 1979) a *Flabellula patuxent* (Bovee & Sawyer, 1979). Novější studie žádné cysty nenalezly, ale také uvádějí (Dyková *et al.*, 2008a), že při menším zvětšení lze zaměnit cysty s kulovitými umírajícími buňkami améb. Trofozoit flabellul má vějířovitý tvar a dosahuje velikosti okolo 20  $\mu\text{m}$  (Obr. 7) (Dyková *et al.*, 2008a). U flabellul byla také nalezena pseudocysta (Fenchel, 2010).

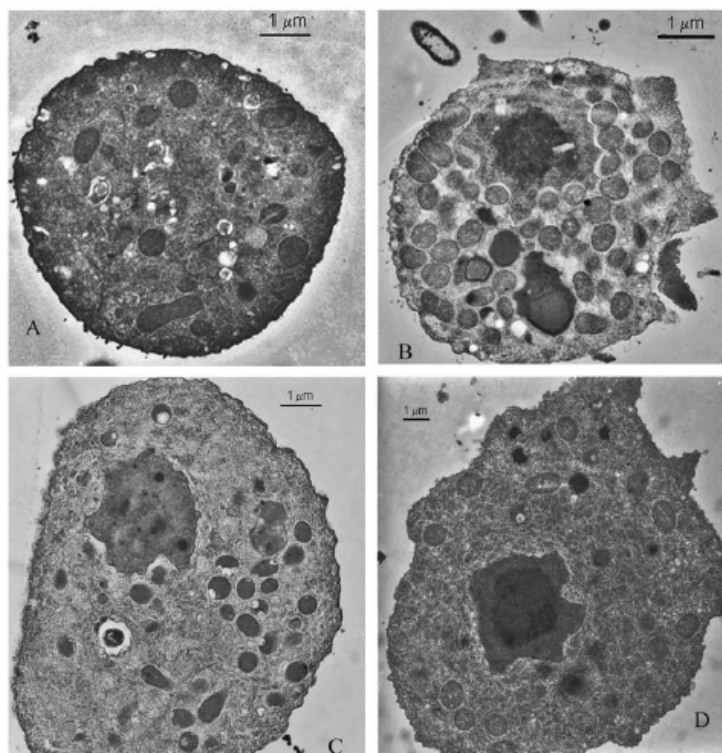


Obr. 7: Trofozoity NETC3v v kultuře staré jeden týden (Dyková *et al.*, 2008a).

Bylo pozorováno, že *Flabellula baltica* dokáže tvořit několik odlišných životních forem. *Flabellula baltica* tvoří klasické trofozoity (Obr. 8: B), které jsou pohyblivé, dále vějířovité formy trofozoitu (Obr. 8: C), ale také dokáže vytvářet pseudocysty (Obr. 8: A, D) (Fenchel, 2010). Pseudocysty jsou zakulacené struktury, ve kterých se dá přežít určitý čas bez známek aktivity. Od běžných cyst se liší nepřítomností zesílené stěny cysty. Pseudocysta nemá tak vysokou schopnost přežití, např. nepřižije úplné vyschnutí (Smirnov & Brown, 2004).

Předpokládalo se, že většina améb má poměrně pomalý růst oproti podobným organismům (např. Butler & Rogerson, 1996), ale generační doba růstu trofozoitů u *Flabellula baltica* je, v porovnání s dalšími heterotrofickými protisty stejné velikosti, poměrně krátká. Např. generační doba pro aktivní formu, kdy se trofozoity množí, je přibližně 2,5 hodiny při 22,1 °C. Postupem času se rychlost růstu zpomaluje, améba se mění ve vějířovité struktury a po 20 hodinách hladovění pak na pseudocystu (Fenchel, 2010).





Obr. 8: Životní formy druhu *Flabellula baltica* na elektronmikroskopických snímcích. A – pseudocysta; B – trofozoit; C – vejřovitá forma; D – starší pseudocysta (Fenchel, 2010).

### 3.2.2.2 Morfotyp

Morfotypem améby máme na mysli obecný vzorec morfodynamické organizace celé buňky. Zahrnuje také přítomnost a nepřítomnost pseudopodií, organizaci uroidu a podobně. Těmito morfotypy se podrobně zabývali Smirnov a Goodkov (1999); Smirnov a Brown (2004). Pro čeled' Flabellulidae byl definován vejřkovitý morfotyp a morfotyp paraflabelluly; v starších analýzách také morfotyp flamelly.

Smirnov a Goodkov (1999) definovali vejřkovitý (flabellate) morfotyp (Obr. 9) následovně: tělo zploštělé s nepravidelnou vejřkovitou strukturou, výraznější přední hyaloplazma s nerovným předním okrajem, žádné subpseudopodie z hyalinní zóny, koncový adhezivní uroid. K tomuto morfotypu jsou pak řazeny všechny známé druhy rodu *Flabellula*: *Flabellula citata*, *F. calkinsi*, *F. demetica*, *F. trinovantica*, *F. baltica* a další.



### **Flabellate**

Obr. 9: Vějířkovitý morfortyp (Smirnov & Goodkov, 1999).

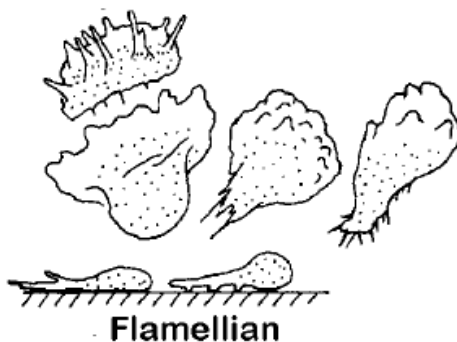
Smirnov a Goodkov (1999) popsali také morfortyp paraflabelluly (Obr. 10). Tento morfortyp je podobný morfortypu flabellul a charakterizuje buňku, která je zploštělá, opět s vějířovitou strukturou. Má výraznou přední hyaloplazmu s velmi krátkými subpseudopodiemi, které vybíhají z hyalinní zóny. Uroid je složen z adhezivních vláken.



### **Paraflabellulan**

Obr. 10: Morfortyp paraflabelluly (Smirnov & Goodkov, 1999).

V novější studii v rámci čeledi Flabellulidae byl také navrhnut morfortyp flamelly (Obr. 11), který je popsán jako buňka, která je buď celkově, a nebo alespoň částečně zploštělá. Tento morfortyp je podobný vějířkovitému morfortypu, ale na rozdíl od něj zástupci „flamellího“ vytváří výrazné subpseudopodie (Smirnov & Brown, 2004). Tento morfortyp je charakteristický pro rod *Flamella*, který však již do čeledi Flabellulidae neřadíme (viz níže).



### **Flamellian**

Obr. 11: Morfortyp flamelly (Smirnov & Brown, 2004).

### 3.2.2.3 Morfologie Flabellulideae

Flabelluly jsou tvořeny jednou buňkou, která nemá žádnou schránku, ale často obsahuje více jader. Buňka améby je plochá, s nepravidelným a rychle se měnícím tvarem (Page, 1983). Flabelluly jsou citlivé (minimálně některé) na světlo používané při Nomarského DIC mikroskopii, formují se pak do nepravidelně kulovitých tvarů (Dyková *et al.*, 2008a).

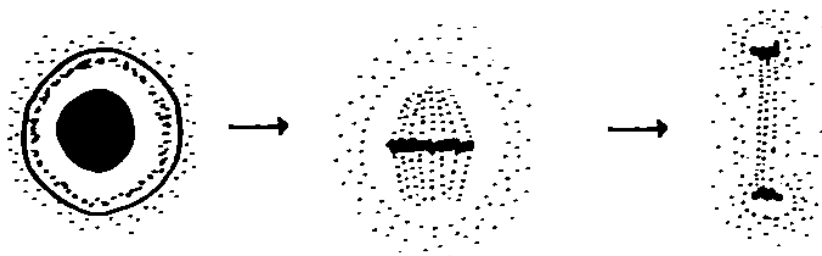
Základním obalem buňky je cytoplazmatická membrána tvořená dvojvrstvou fosfolipidů, která se objevuje u všech buněk eukaryotních organismů. Má za úkol zejména korigovat propustnost jednotlivých látek mezi vnitřním a vnějším prostředím (Letková *et al.*, 2010).

Na povrchu améboidní buňky čeledi Flabellulidae (jako na povrchu většiny buněk) se nachází ještě glykokalyx, což je polysacharidový mukoidní povlak, který kryje výše zmiňovanou cytoplazmatickou membránu (Hausman & Hülsman, 2003). U skupiny Flabellulidae je oproti jiným amébám velmi ztenčený, často nevýrazný (Page, 1983). Jeho funkcí je zejména selektivně absorbovat ionty (prostřednictvím pinocytózy) a další látky z okolí, a také se samozřejmě podílí na informačním systému buňky (Hausman & Hülsman, 2003). Další struktury (např. šupiny či skořápky) se na povrchu flabellul nevyskytují (Page, 1983).

Velmi složitý koloidní systém, který je tvořen zejména fibrilárními strukturami a vyplňuje vnitřní prostor, se nazývá cytoplazmou (Rebanová, 1998). Obsahuje vysoký podíl makromolekul, ale i malých organických částic. Obsah těchto částic způsobuje gelovitou konzistenci. V tomto prostoru, který tvoří více jak jednu polovinu objemu buňky, probíhá velké množství reakcí, ale také zde dochází k interakcím mezi ostatními složkami buňky (Koolman & Röhm, 2012). Cytoplazma améb je rozlišitelná na dvě oblasti – hyaloplazmu (ektoplazmu), což je gelovitá vrstva na okraji buňky, a granuloplazmu (endoplazmu). Tyto dvě části se často liší viskozitou, u améb se mohou lišit i morfologicky (Rebanová, 1998). V cytoplazmě bylo u skupiny Flabellulidae nalezeno bohaté hladké endoplazmatické retikulum. Ribozomy jsou úzce spojeny s endoplazmatickým retikulem nebo volně akumulované v cytoplazmě (Dyková *et al.*, 2008a).

Buňka flabelluly je často vícejaderná, někdy bylo pozorováno až sedm jader (Dyková *et al.*, 2008a). Fenchel (2010) uvádí, že více jader se vyskytuje zejména u stárnoucích buněk. U *Flabellula baltica* bylo v jednom případě nalezeno 32 jader (Fenchel, 2010). Jádra nejsou kulovitá, ale spíše podlouhlá. V týden staré kultuře byly nejčastěji pozorovány dvoujaderné

formy. Výjimečně bylo nalezeno také jedno kulovité jádro centrálně orientované s dobře kondenzovanými chromozomy (Dyková *et al.*, 2008a). Jádro čeledi Flabellulidae se dělí mesomitoticky (Obr. 12), kdy dochází k velmi brzkému rozpadu jaderné membrány (nejčastěji v metafázi, ale může přetrvávat déle). Neobjevují se mikrotubulární struktury homologické centriolám (Page, 1983).



Obr. 12: Jádro dělící se mesomitoticky (Page, 1983).

Flabellulidae jsou aerobní organismy. V jejich buňce se tedy vyskytuje semiautonómni mitochondrie, ve které probíhá dýchání. Mitochondrie je tvořena vnitřní matrix a kristami (Beneš, 1997). U aerobních améb skupiny Amoebozoa nalezneme tubulární kristy (např. Hausman & Hülsman, 2003), u flabellul je pak tvar mitochondrie kulovitý nebo oválný (Dyková *et al.*, 2008a).

Další strukturou, která se běžně vyskytuje u améb, je uroid. Vzniká v důsledku dopředného pohybu buňky, což vede k nahromadění membrány Inoucí k substrátu v zadní části buňky. Tato nahromaděná membrána se nazývá uroid (Guillen *et al.*, 1998). Má různé podoby, u flabellul je často ve formě velmi tenkých vláken. Ale u každého druhu (kmene) je to jiné, u některých (např. kmen M4M) je uroid nezřetelný. Všechny nalezené uroidy byly adhezivní (Dyková *et al.*, 2008a).

#### 3.2.2.4 Příjem potravy

Amoebozoa (i čeleď Flabellulidae) přijímají potravu pomocí fagocytózy a pinocytózy přes membránu (Letková *et al.*, 2010). Flabellulidae jsou pravděpodobní patogeni až komezálkové ryb a bezobratlých. Pokud by se tato patogenita potvrdila, nebyla by tak drastická jako u jiných parazitických druhů. V potravní vakuole byly nalezeny zbytky bakterií a další struktury neznámého původu (Dyková *et al.*, 2008a).

### 3.2.2.5 „Flabellulí“ pohyb

Améby nemají speciální diferencované pohybové orgány (Smirnov *et al.*, 2005). Améboidní (nebo amébovitý) pohyb zahrnuje pohyb celé buňky a je založen zejména na tvorbě panožek (pseudopodie - dočasný výběžek cytoplazmy), dále na přelévání cytoplazmy a přichytávání se k podkladu (Berger, 2000). Pseudopodie nejsou vyztuženy mikrotubuly, které by zprostředkovávaly pohyb, popřípadě vyztužovaly tyto struktury (Hausman & Hülsman, 2003). Vylučováním extracelulární hmoty vzniká spojení mezi buňkou a substrátem, která se následně váže na transmembránové proteiny, pojící se k cytoskeletu. Při pohybu se aktivně cytoplazma přelévá a tvoří se pseudopodie (Berger, 2000).

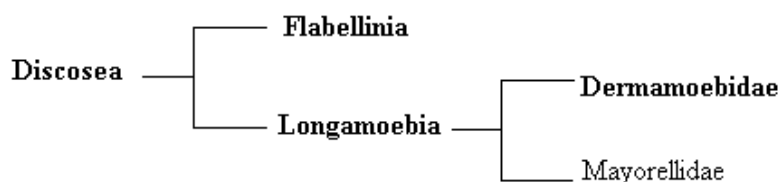
Rychlost tohoto pohybu je silně ovlivnitelná různými podmínkami prostředí, např. osmotickým tlakem, koncentrací vodíkových iontů, koncentrací solí, charakterem substrátu, a také v neposlední řadě závisí na množství dostupných živin (Hopkins, 1937).

### 3.2.2.6 Vnitřní fylogeneze Flabellulidae

Není přesně známo, kolik by měla čeleď Flabellulidae tvořit rodů. Podle dostupné literatury (např. Page, 1983), obsahuje tato skupina dva až tři rody – rod *Flabellula* a *Paraflabellula*, historicky rod *Flamella*. Ale představy o fylogenezi skupiny nejsou jasné, ani ustálené. Některé zdrojem, např. Kostka *et al.* (2013), uvádějí, že by se mohlo jednat i o polyfyletickou skupinu tvořící dvě zcela oddělené linie. Ani u samotných rodů *Flabellula* a *Paraflabellula* nebyla potvrzena monofylie. Některé analýzy se přiklání k parafylii rodu *Paraflabellula* (např. Tekle *et al.*, 2008), problém je například v častém promíchání s rodem *Rhizamoeba* z čeledi Leptomyxidae, popř. se špatným určením a následným pojmenováním v genové bance (Dyková *et al.*, 2008a; Tekle *et al.* 2008).

#### 3.2.2.6.1 Historie objevení a zařazení skupiny

Rod *Flabellula* byl popsán roku 1926 jako skupina mořských améboidních prvoků (Schaeffer, 1926) a byl původně řazen do čeledi Mayorellidae. Mayorellidae jsou skupinou, která je dnes také řazena do skupiny Amoebozoa, Discosea, další zařazení viz obrázek (Obr. 13).



Obr. 13: Dnešní zařazení čeledi Mayorellidae (dle Smirnov *et al.*, 2011).

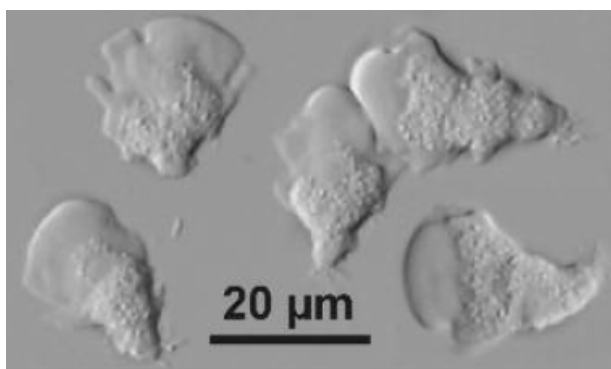
V 70. letech minulého století vznikla nová čeleď Flabellulidae, kterou poprvé pojmenoval Bovee (1970), a do této čeledi byl zařazen rod *Flabellula*.

Později do čeledi Flabellulidae byly zařazeny i další rody. Čeleď obsahuje rody *Flabellula*, *Paraflabellula* a podle některé dostupné starší literatury i rod *Flamella* (např. Page, 1983). Příslušnost tohoto rodu k čeledi Flabellulidae byla na základě morfologie potvrzena Michelem a Smirnovem (1999), ale zpochybněna molekulárními studii (viz níže). Celkové představy o fylogenezi čeledi stále nejsou jisté a vytváří podmínky pro nový výzkum a celkové přezkoumání.

Momentálně uznávané rody *Flabellula* a *Paraflabellula* jsou odlišeny spíše morfologicky. Molekulárně se tyto rody překrývají. Např. Tekle *et al.* (2008) předpokládají podle jejich studie, že rod *Paraflabellula* je parafyletický. Ale je třeba celková revize obou těchto rodů.

### 3.2.2.6.2 Rod *Flabellula*

Rod *Flabellula* je jednou ze skupin améb řazených do studované čeledi. Plovoucí formy jsou nepravidelně oválné, trofozoity vykazují přibližně trojúhelníkový tvar (Obr. 14). Pohyblivá forma má dobře vyvinutou přední hyaloplazmatickou zónu (Dyková *et al.*, 2008a).

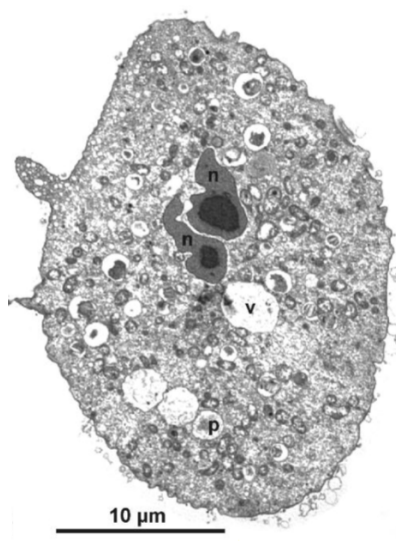


Obr. 14: Trofozoit druhu *Flabellula* sp. kmene M4M s vějířkovitým tvarem buňky. Nomarski DIC (Dyková & Kostka, 2013).

Nejlépe probádaným druhem je *Flabellula citata* Schaeffer, 1926, která byla popsána roku 1926 a dosahuje velikosti 15–75  $\mu\text{m}$  (průměrně 24–40  $\mu\text{m}$ ) (Page, 1983), z této délky připadá až 35  $\mu\text{m}$  na pseudopodie (Bovee & Sawyer, 1979). Jádro je pak velikosti 4–12,4  $\mu\text{m}$ . Některé buňky tohoto druhu mohou být jednojaderné, jiné vícejaderné. Povrchová vrstva vně plazmatické membrány (glykokalyx) je téměř nezřetelná (Page, 1983). Uroid je poměrně běžný, jde o velmi jemná vlákna (Dyková *et al.*, 2008a). Tento druh žije nejčastěji ve slaných vodách, toleruje různou škálu slanosti vody. Výskyt je potvrzen ze severských moří – severozápad Atlantského oceánu, případně východní pobřeží Velké Británie (Page, 1983), dále pobřeží USA, hlavně Florida (Bovee & Sawyer, 1979). Trofozoity vykazují nepravidelnou hyaloplazmatickou zónu mírně zúženou oproti granuloplazmě (Dyková *et al.*, 2008a).

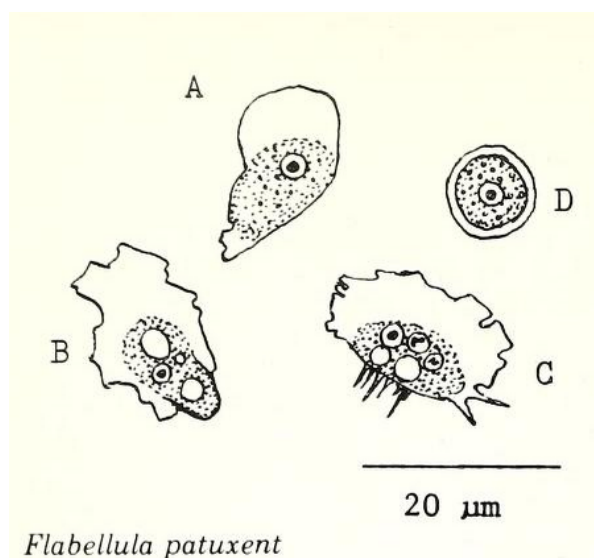
Améba druhu *Flabellula calkinsi* Hogue, 1914 je oproti *Flabellula citata* výrazně menší. Největší rozměry, kterých tento druh dosahuje, jsou uváděny v rozmezí 8–30  $\mu\text{m}$ . Často se vyskytují jednojaderné buňky, vícejaderné pak v mladých kulturách (klidně i 3–5 jader). Glykokalyx je amorfni, tenký, ale zřetelný (Page, 1983). Celá améba vykazuje nepravidelně kulovitý tvar s pseudopodiemi do 25  $\mu\text{m}$ . Ektoplazma se zdá být čistá, endoplazma granulární (Bovee & Sawyer, 1979). Byl také pozorován výrazný kanibalismus. Výskyt byl zaznamenán v severozápadním Atlantiku v trávicím traktu ústřic, ale nenašly se žádné výrazné patogenní účinky (Page, 1983).

*Flabellula trinovantica* (Page, 1980) je velmi malá flabellula, jež dosahuje rozměrů 7,4–16  $\mu\text{m}$  (Obr. 15). Plovoucí formy mají kulovitý sférický tvar s hladkým povrchem. Glykokalyx je opět amorfni. Vyskytuje se na východě Velké Británie (Page, 1983).



Obr. 15: Trofozoit *Flabellula trinovantica*, TEM snímek. V – vakuola, n – jádro, p – phagosom (Dyková & Kostka, 2013).

*Flabellula patuxent* Hogue, 1921 je améba polokruhovitého tvaru. Její rozměry se průměrně pohybují okolo 21  $\mu\text{m}$  v délce a 12  $\mu\text{m}$  v šířce (Obr. 16). Živí se pohlcováním bakterií. Žije jako komenzál ve střevě trávicího traktu ústřic. U tohoto druhu se vyskytují trojvrstevné cysty (Bovee & Sawyer, 1979).



Obr. 16: *Flabellula patuxent*. Označení: A, B,C – trofozoity; D – cysta (Bovee & Sawyer, 1979).

*Flabellula demetica* (Page, 1980) je další malou amébou s velikostními rozměry 2,8–7,4  $\mu\text{m}$  (průměrně okolo 4  $\mu\text{m}$ ), některé vytváří dvě hyaloplazmatické zóny. Plovoucí formy jsou zaoblené, někdy se objevují 2–3 pseudopodia. Glykokalyx tvoří velmi silný obal (až 2,5 nm) separovaný od plazmatické membrány mezerou širokou asi 4 nm (Page, 1983).

Dalším opomíjeným druhem je *Flabellula pelucida* Schaeffer, 1926. Polokulovitá améba s rozměry okolo 30–40  $\mu\text{m}$  a s krátkými tupými pseudopodii. Vyskytuje se v mořích při pobřeží, byla zaznamenána v Mexiku, USA, zejména na Floridě (Bovee & Sawyer, 1979).

### 3.2.2.6.3 Rod *Paraflabellula*

Rod *Paraflabellula* tvoří zřetelné radiální subpseudopodie, které vznikají z přední hyaloplazmatické zóny. Vyskytují se ve vlhkém prostředí, často ve slaných, ale i sladkých vodách (Page, 1983). Druhy tohoto rodu mají tendenci být vícejaderné. Obecně rod *Paraflabellula* netvoří cysty, zatím byly popsány pouze u druhu *P. kudoi* (Singh & Hanumaiah, 1979). Rod *Paraflabellula* se zdá být parafyletický (např. Tekle *et al.*, 2008).

Nejznámějším druhem rodu je *Paraflabellula hoguae* Sawyer, 1975, která má velmi



krátké tupé subpseudopodie. Povrch kryje tenký glykokalyx. Jádro má vezikulární strukturu a je umístěno centrálně (Zettler *et al.*, 2000).

*Paraflabellula reniformis* Schmoller, 1964 s velikostním rozpětím 8,4–45  $\mu\text{m}$  se vyznačuje tupými pseudopodiemi dlouhými až 4  $\mu\text{m}$  (Page, 1983). Tělo je opět kryto velmi tenkým glykokalyxem (Zettler *et al.*, 2000).

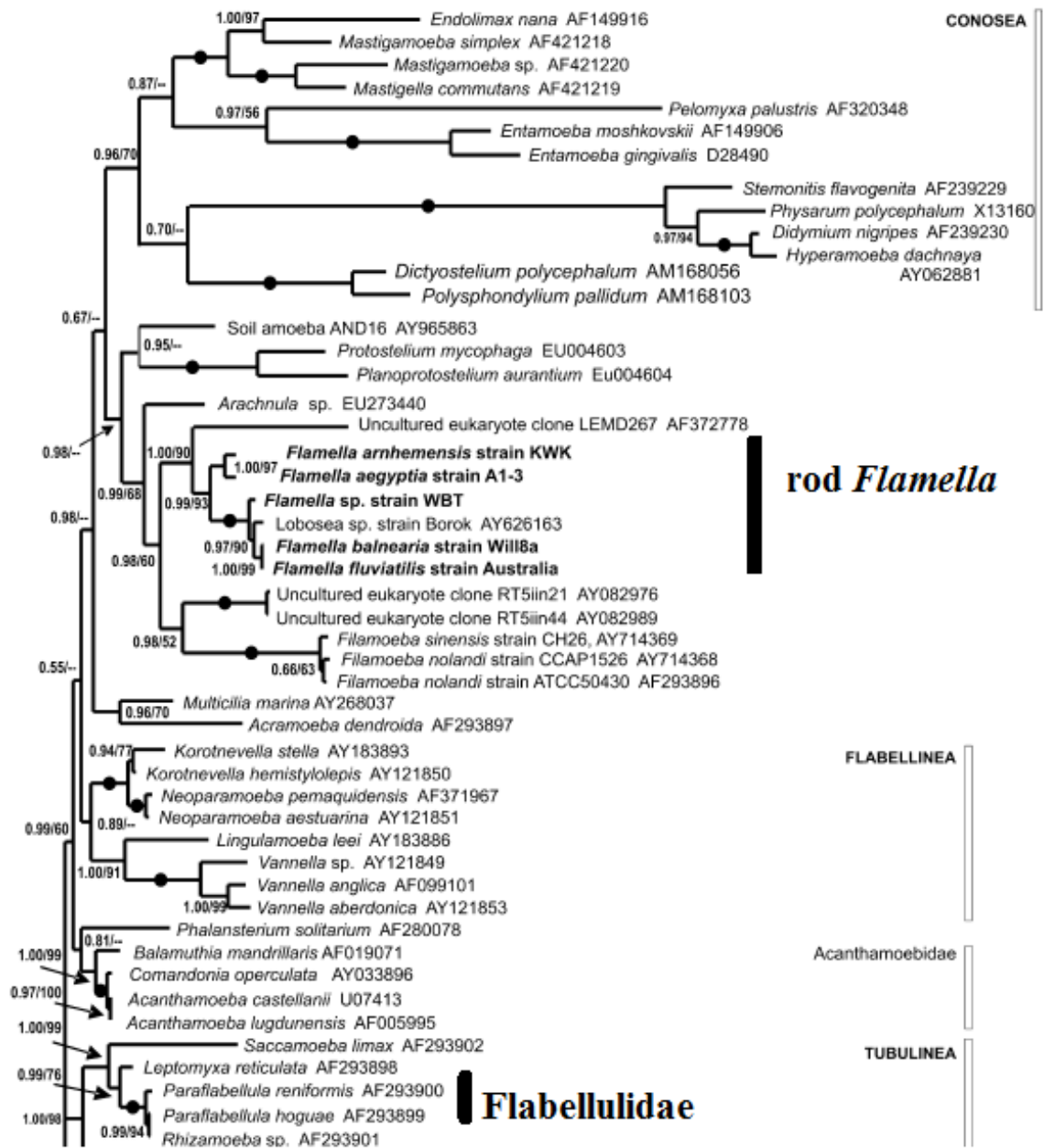
#### 3.2.2.6.4 Další organismy řazeny do skupiny Flabellulidae

Do čeledi Flabellulidae býval také často zahrnován rod *Flamella* Schaeffer, 1926, např. Page, (1983).

Rod *Flamella* po objevení kvůli nedostatku informací (pouze na základě morfologie) byl zahrnován do skupiny Hyalodiscidae Poche, 1913 (Kudryavtsev *et al.*, 2009), která je i dnes velmi problematickou skupinou – řazena do Discosea *incertae sedis* (např. Smirnov *et al.*, 2011). Po revizi v 80. letech na základě morfologie byl rod přiřazen k čeledi Flabellulidae (Page, 1983), kam jej zařazovaly i novější studie, popř. další studie toto zařazení používají (např. Fishbeck & Bovee, 1993; Michael & Smirnov, 1999; Mrva, 2003). Další revize pak tento rod zase řadí do jiných skupin. Vyřazují ho ze skupiny Leptomyxida (např. Adl *et al.*, 2005; Smirnov & Brown, 2004; Smirnov *et al.*, 2005), kvůli neschopnosti měnit tvar pseudopodií jako flabelluly (z vějířkovitého do subcylindrického tvaru). Rod byl zařazen do skupiny Amoebozoa jako *incertae sedis* (Smirnov *et al.*, 2005) nebo Flabellinea *incertae sedis* (Adl *et al.*, 2005). Až do roku 2009 nebyly známy žádné genové sekvence této skupiny. Jejich postavení prozatím nemohlo být objasněno. V roce 2009 bylo získáno 5 sekvencí genu pro SSU rRNA, které nastiňují postavení této skupiny (Obr. 17) (Kudryavtsev *et al.*, 2009). Ze skupiny Flabellulidae byl tento rod definitivně vyloučen. Podle nejnovější analýzy rod *Flamella* patří konkrétně do skupiny Conosa, Semiconosia a Variosea (Cavalier-Smith *et al.*, 2015).

Rod *Flamella* je skupinou améb oválného nebo kulovitého tvaru s krátkými kuželovitými subpseudopidii. Jádro je uprostřed tvořeno jadérkem, uroid je často tvořen tenkými vlákny (Mrva, 2003).

*Flamella tiara* Fishbeck & Bovee, 1993 je sladkovodní druh, 30–40  $\mu\text{m}$  dlouhý a 12–25  $\mu\text{m}$  široký, s mnoha kónickými krátkými subpseudopodiemi (do velikosti 3,5  $\mu\text{m}$ ). Má nezřetelné kulovité jádro o velikosti zhruba 3,5  $\mu\text{m}$ . Endoplazma je mírně granulovaná bez krystalků. Pohybuje se rychlostí od 40 do 50  $\mu\text{m}/\text{min}$ , zřídka až 70  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Fishbeck & Bovee, 1993).



Obr. 17: Novější zařazení rodu *Flamella* s vyznačením čeledi Flabellulidae (Kudryavtsev et al., 2009).

## 4 Praktická část bakalářské práce

### 4.1 Hypotézy

Již dříve byly provedeny fylogenetické analýzy, které se zabývaly fylogenezí čeledi Flabellulidae, ale představy o fylogenezi nejsou stále jasné (Dyková *et al.*, 2008a; Kostka *et al.*, 2013; Tekle *et al.*, 2008).

Jedna z prvních fylogenetických analýz této skupiny (Dyková *et al.*, 2008a) zařadila podle sekvencí SSU rDNA čeleď Flabellulidae do skupiny Leptomyxida do příbuznosti k rodu *Rhizamoeba*. Následně (Kostka *et al.*, 2013) však byly získány další sekvence SSU rDNA a aktinových genů. Sekvence SSU rDNA vytvářejí ve fylogenezi této skupiny nejasnosti. Vznikají dvě skupiny flabellul, každá se ve fylogenezi zařazuje jinam – jedna spadá k linii leptomyxidů (skupina A), druhá skupina flabellul se pak řadí jako sesterská k rodům *Amoeba* a *Chaos* (skupina B), tedy podstatně jinam než se původně předpokládalo. Tento fakt by se pak dal zhodnotit tak, že celá studovaná skupina je polyfyletická.

Celkově získaných sekvencí není dostupné velké množství (nejčastěji SSU rDNA, malé množství sekvencí aktinových), není tedy možno říci více o fylogenetických vztazích. V této bakalářské práci bylo snahou získat více sekvencí různých genů z různých kmenů a vzorků flabellul, rozšířit fylogenetická data, více osvětlit vztahy mezi jednotlivými „druhy“ (kmeny) a pokusit se zodpovědět tyto otázky: Kolik tato skupina doopravdy tvoří „rodů“? Korespondují tyto rody s morfologicky uznávanými rody – *Flabellula* a *Paraflabellula*? Jde o monofyletickou skupinu?

Na základě předběžného studia byly formulovány tyto dvě hypotézy k ověření:

- Nulová hypotéza: Flabellulidae jsou monofyletickou skupinou.
- Alternativní hypotéza: Flabellulidae jsou polyfyletická čeleď.

### 4.2 Materiál

Pro tuto práci byly použity vzorky flabellulidních améb nejčastěji rodu *Flabellula* a *Paraflabellula* izolované z ryb, vodních bezobratlých, písku a různých sedimentů ze slaných a sladkých vod. Vzorky pocházejí z různých částí světa a byly poskytnuty Laboratoří rybí protistologie Parazitologického ústavu AV ČR jako vyizolovaná DNA (Tab. I). Další vzorky byly poskytnuty RNDr. Tomášem Tymlem (Tab. II), stejně tak jako již vyizolovaná DNA. Také byly zařazeny vzorky rodu *Saccamoeba* (snaha o rozšíření souboru sekvencí).

Tab. I: Soupis vzorků používaných během praktické části bakalářské práce poskytnuté Laboratoří rybí protistologie AV ČR.

vzorek DNA	označení kmene	druh	původ (popř. místo sběru)
20	S30127	-	-
125	1HFKS	-	sladká voda / <i>Heteropneustes fossilis</i> / slezina
328	CCAP1529/2	<i>Flabellula citata</i>	moře
340	SBGL1	-	moře / Sicílie, Itálie <i>Dicentrarchus labrax</i> / žábry
346	CCAP1529/4	<i>Flabellula trinovantica</i>	z anglické sbírky
350	SEDF	<i>Paraflabellula</i> sp.	moře / <i>Salmo salar</i>
389	NETC3	-	moře
400	M4M	-	moře / Mexiko / <i>Sufflamen verres</i> / žábry
553	CCAP1529/3	<i>Flabellula demetica</i>	sladká voda
764	ROD5G	-	moře / Vigo, Španělsko / <i>Psetta maxima</i>
768	ROD2G	-	moře / Vigo, Španělsko / <i>Psetta maxima</i> / žábry
782	ROD4G	-	moře / Vigo, Španělsko / <i>Psetta maxima</i> / žábry
1005	RT1TT	<i>Paraflabellula</i> sp.	písek/ Costa Rica
1048	W187G	<i>Saccamoeba</i>	sladká voda / <i>Carassius gibelio</i> / žábry
1065	MSED6	<i>Saccamoeba</i>	sladká voda / Baoan Lake, Čína / sediment
1231	PV67	<i>Saccamoeba</i>	sladká voda
1307	-	<i>Acanthamoeba</i> sp.	-

Tab. II: Vzorky poskytnuté RNDr. Tomášem Tymlem.

vzorek DNA	označení	druh	původ, místo sběru
DE49	GAU17	<i>Flabellula</i> sp.	moře / řasa rodu <i>Laminaria</i> / Norsko
DE50	-	<i>Flabellula</i> sp.	moře / písek / Filipíny
DE52	GAU16	<i>Flabellula</i> sp.	moře / řasa rodu <i>Laminaria</i> / Norsko
DE53	-	-	-

### 4.3 Metody

Stručný přehled metod, které byly během praktické části bakalářské práce aplikovány:

- Izolace DNA (nebyla prováděna, vzorky byly poskytnuty jako izolovaná DNA)
- Amplifikace vybraných genů
- Elektroforéza
- Extrakce PCR produktů
- (Klonování) – pouze u některých vzorků
- Sekvenace
- Analýza sekvencí

#### 4.3.1 Amplifikace vybraných proteinů – pomocí PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) slouží k namnožení určitého úseku DNA do obrovského množství kopií (Alberts *et al.*, 2013). Během jednoho cyklu dojde k několika krokům:

- Denaturace dvoušroubovice – v mém případě byla reakce zahřívána nejčastěji na teplotu 94 °C po dobu jedné minuty, v této fázi došlo k narušení vodíkových můstků v dvoušroubovici DNA, vznikla samostatná vlákna.
- Annealing primerů – na samostatná vlákna původní dvoušroubovice nasedají příslušné primery, ty ohraničují úsek, který se bude dále množit.
- Syntéza vlákna – dochází k enzymatické syntéze nového vlákna DNA v mém případě při teplotě 72 °C (kvůli zvolené Taq polymeráze) (Bartlett & Stirling, 2003).

Pomůcky: Mikropipety (Eppendorf), mikrozkušavky.

Chemikálie: Deionizovaná voda, reakční pufr, dNTP, příslušné primery, Taq polymeráza.

Postup: Reakční směs pro PCR byla připravována z deionizované vody, reakčního pufru, primerů a Taq polymerázy (Tab. III). Tato reakční směs byla rozplněna do jednotlivých mikrozkušavek po 24 µl a byl přidán 1 µl DNA (do mikrozkušavek s negativní kontrolou byla místo DNA přidávána deionizovaná voda).

Tab. III: Složení reakční směsi pro PCR.

chemikálie	množství (μl) na jednu zkumavku
deionizovaná voda	16,5
pufř	2,5
dNTP	2,5
forward primer	1
revers primer	1
Taq polymeráza	1
DNA	1

Podle studovaného genu byl zvolen program v cykleru (Biometra). Základní program (Tab. IV) se skládal z počáteční denaturace, dalších tří kroků (denaturace, annealingu a syntézy vlákna), které se 30–40x opakovaly, a následné extenze. Během amplifikace jednotlivých genů docházelo k malým obměnám annealingové teploty, popř. času, po který jednotlivé kroky probíhaly.

Tab. IV: Časové a teplotní rozložení základního programu.

	teplota (°C)	čas
počáteční denaturace	94	10 minut
1. krok	95	1 minuta
2. krok	52	1 minuta
3. krok	72	1 minuta 30 sekund
finální extenze	72	10 minut

#### 4.3.1.1 Gen pro SSU rRNA

Pro amplifikaci SSU rDNA byly využity primery ERIB0 a ERIB1 (Tab. V) pro amplifikaci a následně sekvenaci vnějších částí (Bárta *et al.*, 1997). Pro sekvenaci vnitřní části genu pro SSU rRNA byly využity další primery (460F, 620F, 1200F, 1350R nebo 1700R) tak, aby mohl být sestaven celý gen pro SSU rRNA.

Tab. V: Sekvence jednotlivých primerů.

název primeru	cílová sekvence	sekvence 5'→3'
R primer ERIB1	SSU rRNA	CTTCCGCAGGTTACCTACGG
F primer ERIB0	SSU rRNA	ACCTGGTTGATCCTG CCA G
F primer 460	SSU rRNA	CAGCAGGCGCGCAAATTA
F primer 620	SSU rRNA	GCCAGCACCCGCGGTAATTCC
F primer 1200	SSU rRNA	GATCAGATACCGTCGTTAGTC
R primer 1350	SSU rRNA	CCGTCAATTCCTTTAAGTTTC
R primer 1700	SSU rRNA	GGCATCACAGACCTGTTAT

Gen pro RNA malé ribozomální podjednotky byl amplifikován pomocí jednoduché PCR reakce s primery ERIB10 a ERIB1 (Bárta *et al.*, 1997), při které byla použita annealingová teplota 50 °C a doba 3. kroku byla prodloužena na dvě minuty oproti původnímu předpisu v bodě 4.2.1 (Tab. IV). 1.–3. krok se během amplifikace opakoval celkově 30x, aby mohlo dojít k dostatečnému namnožení.

#### 4.3.1.2 Gen pro aktin

Pro amplifikaci genu pro aktinového proteinu byly zvoleny primery, pokud se jednalo o přímou sekvenaci, ActF a ActR (Tab. VI) (Tekle *et al.*, 2007). Byly použity i pro přímou sekvenaci, v několika případech však bylo kvůli malé míře polymorfismu přikročeno ke klonování.

Tab. VI: Sekvence primerů pro amplifikaci a přímou sekvenaci.

název primeru	cílový gen	sekvence 5'→3'
ActF	Aktin	AACTGGGAYGAYATGGARAAGAT
ActR	Aktin	ATCCACATYTGYTGGAANGT

Pokud byl vzorek zaklonován a následně také využit na sekvenování, jako primery byly použity M13F a M13R – primery cílicí klonovací vektor (Tab. VII).

Tab. VII: Sekvence jednotlivých primerů pro přímou sekvenaci.

název primeru	cílový gen	sekvence 5'→3'
M13F	Aktin	TGTAACACGACGGCCAGT
M13R	Aktin	CAGGAAACAGCTATGACC

#### 4.3.1.3 Gen pro $\alpha$ -tubulin

Pro amplifikaci genu pro  $\alpha$ -tubulinový protein byly zvoleny primery  $\alpha$ -tubF1 a  $\alpha$ -tubR1 (Tekle *et al.*, 2007). Sekvence těchto primerů jsou zapsány v tabulce (Tab. VIII).

Tab. VIII: Sekvence primerů pro amplifikace genu pro  $\alpha$ -tubulin.

primer	cílový gen	sekvence 5'→3'
$\alpha$ -tubF1	$\alpha$ -tubulin	CTAGGCAAYGCNTGYTGGGA
$\alpha$ -tubR1	$\alpha$ -tubulin	CATGCCTTCNCCNACRTACC

Pro větší efektivitu amplifikace konkrétní části genetické informace byl kromě klasického programu PCR také zvolen modifikovaný způsob PCR – nested PCR, kdy je amplifikace prováděna ve dvou krocích. V prvním kroku PCR se do master mixu přidává klasicky přiměřené množství DNA (v tomto případě 1  $\mu$ l). Předpis pro tuto reakci je stejný jako v tabulce výše (Tab. III).

V druhém kroku měla reakční směs stejné složení, pouze DNA byla nahrazena přečištěným produktem z první reakční směsi v množství 1  $\mu$ l. Pro oba kroky byl použit stejný program v cykleru, stejný jako výše (Tab. IV). Byla pouze pozměněna annealingová teplota v 2. bodě na 48 °C a čas 3. kroku byl snížen na 40 sekund. 1.-3. krok se opakoval 35x v prvním případě a 30x v případě druhém.

#### 4.3.1.4 Mitochondriální gen pro COX1

Pro studovaný gen COX1 byly zvoleny primery HCO a LCO, sekvence těchto primerů jsou uvedeny v tabulce (Tab. IX) (Vrijenhoek, 1994).

Tab. IX: Sekvence jednotlivých primerů.

název primeru	cílový gen	sekvence 5'→3'
HCO	COX1	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
LCO	COX1	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG

Byl použit klasický předpis pro amplifikaci pomocí PCR jako v bodě 4.2.1 (Tab. IV).

#### 4.3.1.5 Chaperon Hsp90

Pro amplifikaci genu pro Hsp90 byly využity dvě kombinace primerů: HspF1, HspR1 a HspF1, HspR2 (Tab. X). Tyto primery byly použity dle Shalchian-Tabrizi *et al.* (2006). Byl



použit klasický předpis pro amplifikaci pomocí PCR jako v bodě 4.2.1 (Tab. IV).

Tab. X: Sekvence jednotlivých primerů.

primer	cílový gen	sekvence 5'→3'
HspF1	Hsp90	ATG TCTGAAGGTCCAGCT ATTGGTATTGA
HspR1	Hsp90	GCAGGATGTAGGGATCCTCC
HspR2	Hsp90	CCTCTATTTATACTCCGGCGCTCT

V dalším případě byla také využita modifikovaná semi-nested PCR, která se skládala za dvou fází. Semi-nested PCR byla použita ve stejném složení a ve stejných krocích jako v bodě 4.2.1.3 pro amplifikaci genu pro  $\alpha$ -tubulinový protein.

#### 4.3.1.6 Elongační faktor-1 $\alpha$

Amplifikace byla také prováděna u genu pro EF-1 $\alpha$ . Pro zvolený gen byly vybrány primery EF1F, EF2F, EF10R a EF7R (Tab. XI) (Baldauf & Doolittle, 1997) v různých kombinacích.

Tab. XI: Sekvence primeru určených pro EF-1 $\alpha$ .

název primeru	cílový gen/protein	sekvence 5'→3'
EF1F	EF-1 $\alpha$	GGATTCGTTATTGGNCAYGTNGA
EF2F	EF-1 $\alpha$	CTCGAGAARAAYATGATNACNGG
EF10R	EF-1 $\alpha$	CGNCANCCTCATTACCTAGGTCT
EF7R	EF-1 $\alpha$	CCNCTRTRCAACCTAGGTTGCA

Byl použit klasický předpis pro amplifikaci pomocí PCR jako v bodě 4.2.1 (Tab. IV). V dalším případě byla také využita modifikovaná nested PCR, která se skládala za dvou fází. Nested PCR byla použita také ve stejném složení a ve stejných krocích jako v bodě 4.2.1.3 pro amplifikaci genu pro  $\alpha$ -tubulinový protein.

#### 4.3.2 Elektroforéza

Směs (v mém případě produkt PCR), která obsahuje DNA, je vložena do připravených jamek na gelu. Jde o metodu, která jednotlivé amplifikované fragmenty odděluje pomocí elektrického pole. DNA má negativní náboj a pohybuje se tedy ke kladné elektrodě. V mém případě byl gel složen z 1% agarózy, což je vlastně síť vláken, kterými

jednotlivé fragmenty postupují, dlouhé fragmenty postupují pomalu, kdežto krátké fragmenty rychleji. Vzniká žebříček, kde jsou rozděleny jednotlivé fragmenty podle velikosti (Alberts *et al.*, 2013).

Pomůcky: Mikropipety (Eppendorf), elektroforézová vanička, hřebínek na tvorbu jamek.

Chemikálie: 0,5 x TAE pufr, agaróza, ethydium bromid, 1kb ladder, 100b ladder.

Postup: Nejdříve byl připraven přibližně 1% roztok agarózy, který je doplněna TAE puffrem požadovaném množství. Roztok agarózy a pufru se musel zahřát v mikrovlnné troubě, aby se agaróza rozpustila, a poté se nalil do elektroforetické vaničky a nechal utuhnout (cca 30–45 minut podle velikosti gelu). Zdroj pro elektroforézu byl během mých pokusů nastaven na 80 V; v některých případech na 100 V.

Pomocí této rozdělovací metody byly získány jednotlivé velikostní fragmenty DNA (vybrané geny) příslušných améb čeledi Flabellulidae. Úseky patrné kvůli ethydium bromidu pod UV osvětlením, byly z gelu vyjmuty pomocí skalpelu a následně extrahovány a připraveny na sekvenaci.

#### **4.3.3 Extrakce DNA z gelu**

Pro extrakci jednotlivých proužků z agarového gelu byl použit Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit od firmy Geneaid. Během extrakce bylo postupováno dle návodu výrobce.

#### **4.3.4 Klonování**

Klonování bylo prováděno pouze u některých vzorků améb jako mezistupeň z důvodu zvýšení kvality sekvencí a jeho izolace.

Klonování se skládá z více částí: z ligace, transformace kompetentních buněk, PCR screeningu a následného namnožení plazmidu.

##### **4.3.4.1 Ligace a transformace kompetentních buněk**

Pro ligaci byl použit PCR Cloning Kit (QIAGEN). Na ligaci bylo potřeba 0,5  $\mu$ l klonovacího vektoru, 2,0  $\mu$ l PCR produktu a 2,5  $\mu$ l ligačního master mixu. Tato směs se nechala inkubovat po dobu 2 hodin při 14 °C.

Po inkubaci bylo přidáno do ligační směsi 50  $\mu$ l suspenze kompetentních buněk, které stály po dobu 5 minut na ledě a poté byly ponořeny do horké vodní lázně (42 °C) po dobu 30 sekund, dále opět ochlazeny na ledě, a to 2 minuty. Do ochlazené reakční směsi

bylo přidáno 200 µl SOC media a poté byly dány třepat na 1 hodinu při teplotě 37 °C.

Na připravené agarové plotny, které obsahovaly LB medium a byly potřeny ampicilinem, bylo přidáno 40 µl X-Gal, na každou plotnu byl napipetován jeden ze vzorků, tyto plotny se poté inkubovaly 16 hodin při 37 °C. Během této doby na agarových plotnách vyrostly modré a bílé kolonie. Bílé kolonie obsahovaly PCR produkt.

#### 4.3.4.2 PCR Screening

Do 1,5 ml zkumavek bylo napipetováno 30 µl deionizované vody. Z agarových ploten byly vypíchnuty vzniklé bílé kolonie, které se přidaly do deionizované vody, tyto zkumavky byly umístěny do teploty 37 °C, kde za stálého míchání zůstaly 10 minut. Reakční směs pro PCR screening obsahovala chemikálie, které jsou vypsány v tabulce (Tab. XII).

Tab. XII: Příprava reakční směsi pro PCR screening.

chemikálie	množství (µl)
10xTaq Buffer complete	1,25
dNTP	1,0
M13 Forward primer	0,5
M13 Revers primer	0,5
Taq polymeráza	0,5
deionizovaná voda	7,25

Do rozplněných zkumavek s reakční směsí musí být také dodána buněčná suspenze (2 µl do každé zkumavky). Následně tyto reakční směsi mohou být vloženy do cykleru, aby mohlo dojít k amplifikaci. Byl použit program SCREEN (Tab. XIII).

Tab. XIII: PCR – program SCREEN.

	teplota (°C)	čas
počáteční denaturace	95	10 minut
1. krok	95	30 sekund
2. krok	54	1 minuta
3. krok	72	1 minuta
finální extenze	72	10 minut

1.–3. krok se během PCR screeningu opakoval celkově 20x.

#### 4.3.4.3 Namnožení plazmidu

Pokud se během vizualizace pomocí agarozové elektroforézy ukázalo, že patřičné bakterie z bílé dané kolonie obsahují fragmenty odpovídající délky, byly bakterie obsahující plazmid namnoženy.

Do zkumavky se 3 ml LB media bylo přidáno 12  $\mu$ l ampicilinu a buněčná suspenze. Na čistou agarovou misku byly jako záloha vytvořeny malé kapičky ze suspenze bakterií. Miska byla inkubována v termostatu při 37 °C celou noc, zkumavky byly po stejnou dobu třepány při 37 °C.

Plazmidy, které obsahovaly hledanou sekvenci, byly extrahovány pomocí soupravy High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) dle návodu výrobce.

#### 4.3.5 Sekvenace

Fragmenty DNA získané přečištěním přímo z agarozového gelu z PCR produktu byly použity do sekvenační reakce, která obsahovala 1  $\mu$ l použitého primeru a 9  $\mu$ l přečištěných fragmentů DNA. Pokud šlo o DNA klonovaného plazmidu, obsah reakční směsi se řídil podle koncentrace příslušného vzorku. Výsledné sekvenační reakce byly odeslány na sekvenaci pomocí Sangerovy metody ke společnosti SeqMe s.r.o.

#### 4.3.6 Zpracování sekvenčních dat, fylogenetické analýzy

Sekvence získané od společnosti SeqMe s.r.o. byly nejdříve prověřeny, zda se jedná o předpokládané sekvence améb určitého genu (COX I, aktin,  $\alpha$ -tubulin, EF-1 $\alpha$ , Hsp90 či SSU rDNA) čeledi Flabellulidae a to pomocí aplikace BLAST, kterou nabízí National Center for Biotechnology Information (NCBI – (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). Nekvalitní sekvence, náhodné fragmenty a podobně, byly odstraněny.

Po ověření a vyhodnocení sekvence byly dílčí sekvence získané z jednoho PCR produktu / klonu složeny ve výslednou sekvenci v programu SeqMan (DNASTAR Inc., USA). Následně byly vytvořeny datasety, které obsahovaly mnou získané sekvence, sekvence získané již dříve Laboratoří rybí protistologie AV ČR a veřejně dostupné sekvence vybrané z genové banky GenBank prostřednictvím NCBI. V této práci bylo vytvořeno více datasetů a z nich více fylogenetických analýz. Byla provedena fylogenetická analýza založená pouze na sekvencích SSU rRNA, dále aktinových a  $\alpha$ -tubulinových genů. Analyzován byl též konkaténát genů pro SSU rRNA, COX1 a aktin.

Soubor sekvencí byl vložen do programu ClustalX (Larkin *et al.*, 2007), kde byly sekvence slazeny dohromady a vytvořen aligment, který byl následně ještě upraven, např.

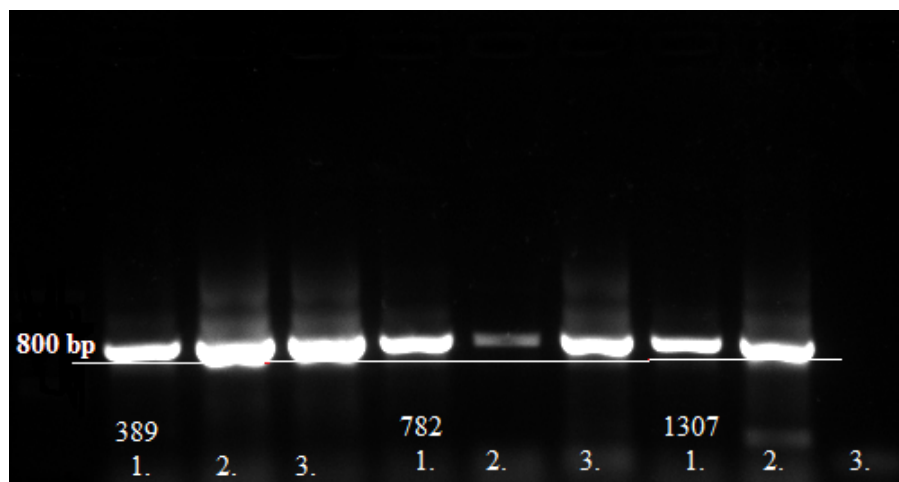
byly odebrány přesahující a špatně homologizovatelné části pomocí programu BioEdit (Hall, 1999). Pro některé fylogenetické analýzy se využívala metoda Maximum Likelihood (ML), pro další pak Bayesovská interference (BI).

Fylogenetické analýzy pomocí metody ML byly vypočteny v programu RAxML 8.0.20 (Stamatakis, 2006), byl využit model GTRGAMMAI (GTR – nejobecnější vzorec evoluce; GAMMA – gamma distribuce; I – proporce invariantních míst). Pro další analýzy pomocí BI byl použit program MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) s výchozím modelem GTR specifikovaným na milión generací; BurnIn byl nastaven na 25 % stromů, které vznikly během analýzy. Výsledné fylogenetické stromy byly prohlíženy a dále upravovány v programu TreeView (Page, 1996).

## 4.4 Výsledky

### 4.4.1 Gelová elektroforéza a PCR

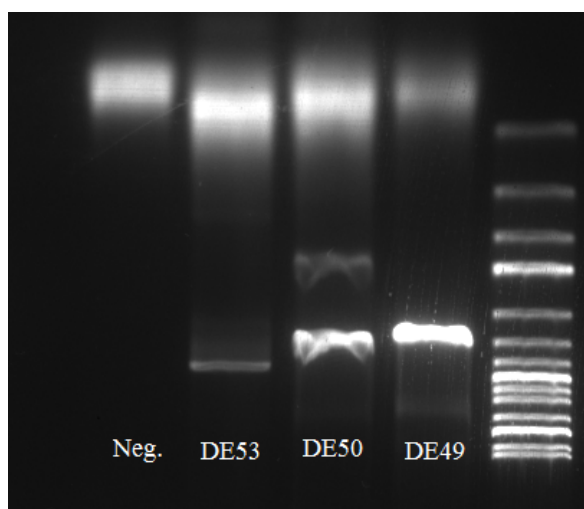
Nejprve byly jednotlivé fragmenty amplifikovány pomocí PCR a následně proběhla jejich vizualizace pomocí 1% agarové elektroforézy. Na obrázku (Obr. 18) lze vidět jeden z výsledných gelů se vzorky amplifikovanými pomocí PCR. Tento gel je příkladem vzorků améb, u kterých byl zkoumán gen pro aktin. Předpokládaná délka cílového genu byla okolo 800–900 bází.



Obr. 18: Vizualizace pomocí agarové elektroforézy – geny pro aktin.

Jako základní gen pro fylogenetické analýzy je využíván gen pro SSU rRNA, který v dnešní době tvoří nejčastější zdroj dat pro budování našich představ o fylogenetických vztazích. Z velké části flabellul už jsou SSU rDNA získány. Pokud k dispozici nebyly, pokusila jsem se o jejich získání, jedna z vizualizací pomocí gelu je vidět níže (Obr. 19).

Očekávaná délka bylo okolo 1500 – 2000 bází.



Obr. 19: Vizualizace pomocí agarozové elektroforézy – SSU rDNA.

Tyto vizualizace (Obr. 18 a Obr. 19) byly vybrány pouze pro ilustraci. Podobně byly vizualizovány také výsledky amplifikace genu pro COX1, Hsp90,  $\alpha$ -tubulin či elongační faktor-1 $\alpha$ .

#### 4.4.2 Sekvence

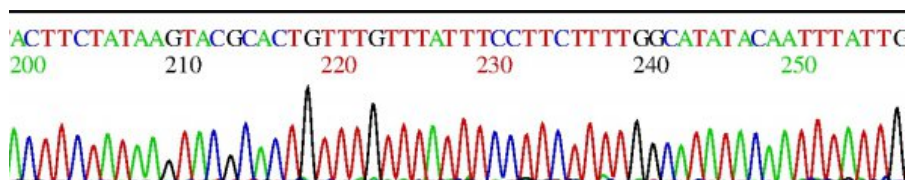
Všechny fragmenty vyhovující délky jednotlivých izolátů améb byly vyřezány, extrahovány z gelu a následně zaslány na sekvenaci.

Během studie se povedlo získat vhodné sekvence různých flabellulidů a genů. Nejvíce sekvencí bylo získáno z genu pro aktin a SSU rRNA, také sekvence genu pro COX1 a pouze jediná použitelná sekvence genu pro  $\alpha$ -tubulin (Tab. XIV). Sekvence chaperonů (Hsp90) a elongačního faktoru-1 $\alpha$  se mi nepodařilo získat vůbec. Celkový počet povedených dílčích sekvencí je 36, pokud bylo sekvencí z jediného PCR produktu, případně klonu více, byly poskládány do výsledné sekvence (14 dohromady).

Tab. XIV: Shrnutí získaných sekvencí. Podtržením označeny vzorky spadající v analýzách SSU rDNA (viz bod 4.3) do skupiny B, nepodtržené do skupiny A.

č. vzorku	jméno	gen	počet podařených dílčích sekvencí	počet výsledných sekvencí
389	NETC3	Aktin	7	3
782	<u>ROD4G</u>	Aktin	6	2
768	<u>ROD2G</u>	$\alpha$ -tubulin	1	1
340	<u>SBGL1</u>	Aktin	1	1
1005	RT1TT	Aktin	1	1
328	<i>F.cit.</i> CCAP1529/2	Aktin	1	1
350	SEDF	COX1	2	1
782	<u>ROD4G</u>	COX1	2	1
DE49	GAU17	SSU rRNA	5	1
DE50	-	SSU rRNA	4	1
DE52	GAU16	SSU rRNA	6	1

Následující obrázek (Obr. 20) ukazuje pro ilustraci část výstupu ze sekvenátoru odpovídající sekvenci genu pro SSU rRNA, na kterou byly pro amplifikaci použity primery ERIB1, ERIB0 a pro sekvenaci primer 460F. Jedná se o vzorek DE49 (GAU17) sekvenovaný společností Seqme s.r.o.

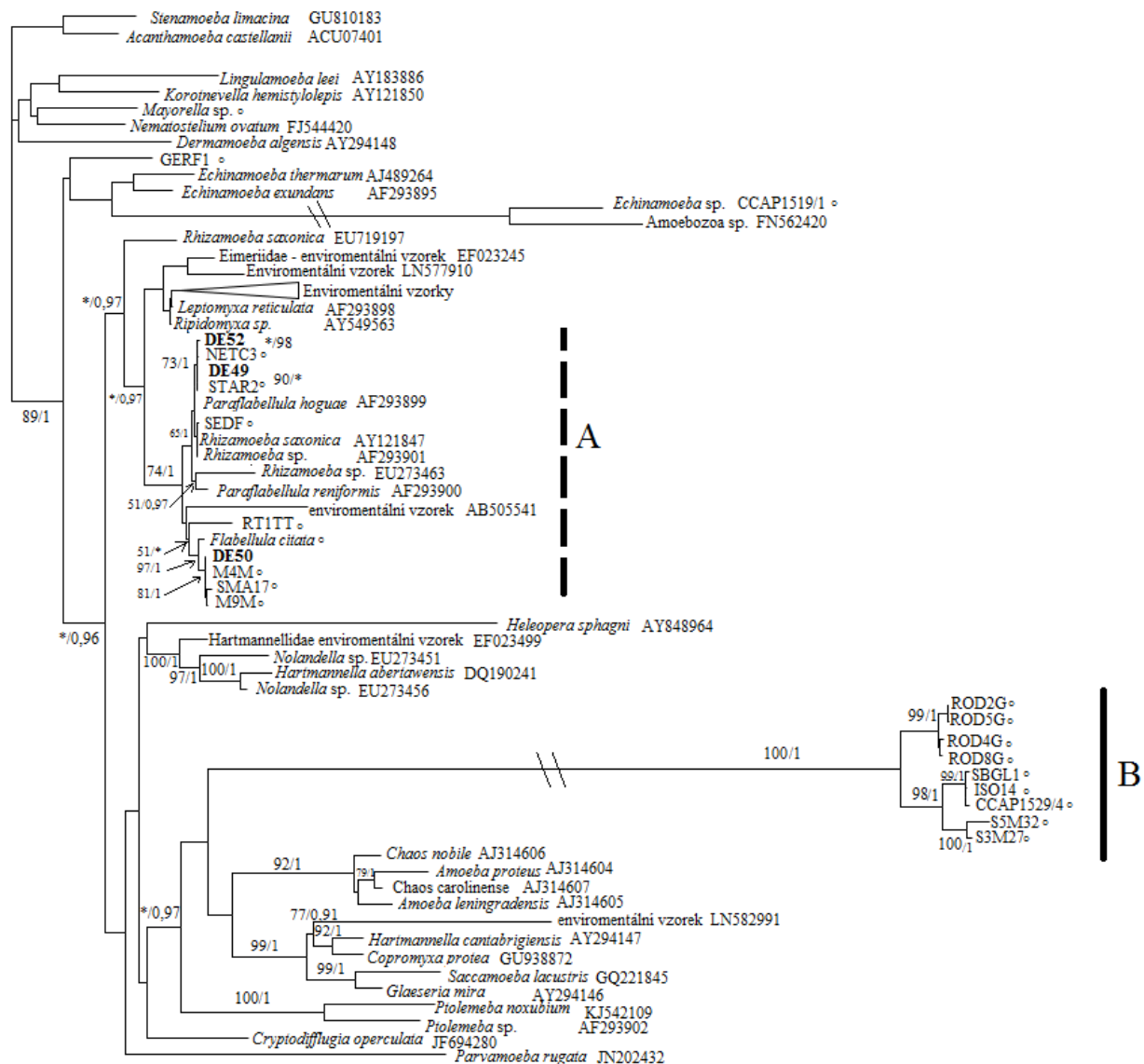


Obr. 20: Část sekvence genu pro SSU rRNA vzorku DE49.

#### 4.4.3 Fylogenetická analýza

Celkově se mi podařilo získat 36 dílčích použitelných sekvencí, které byly poskládány do 14 výsledných sekvencí (Tab. XV), které mohou být využity do fylogenetických analýz.

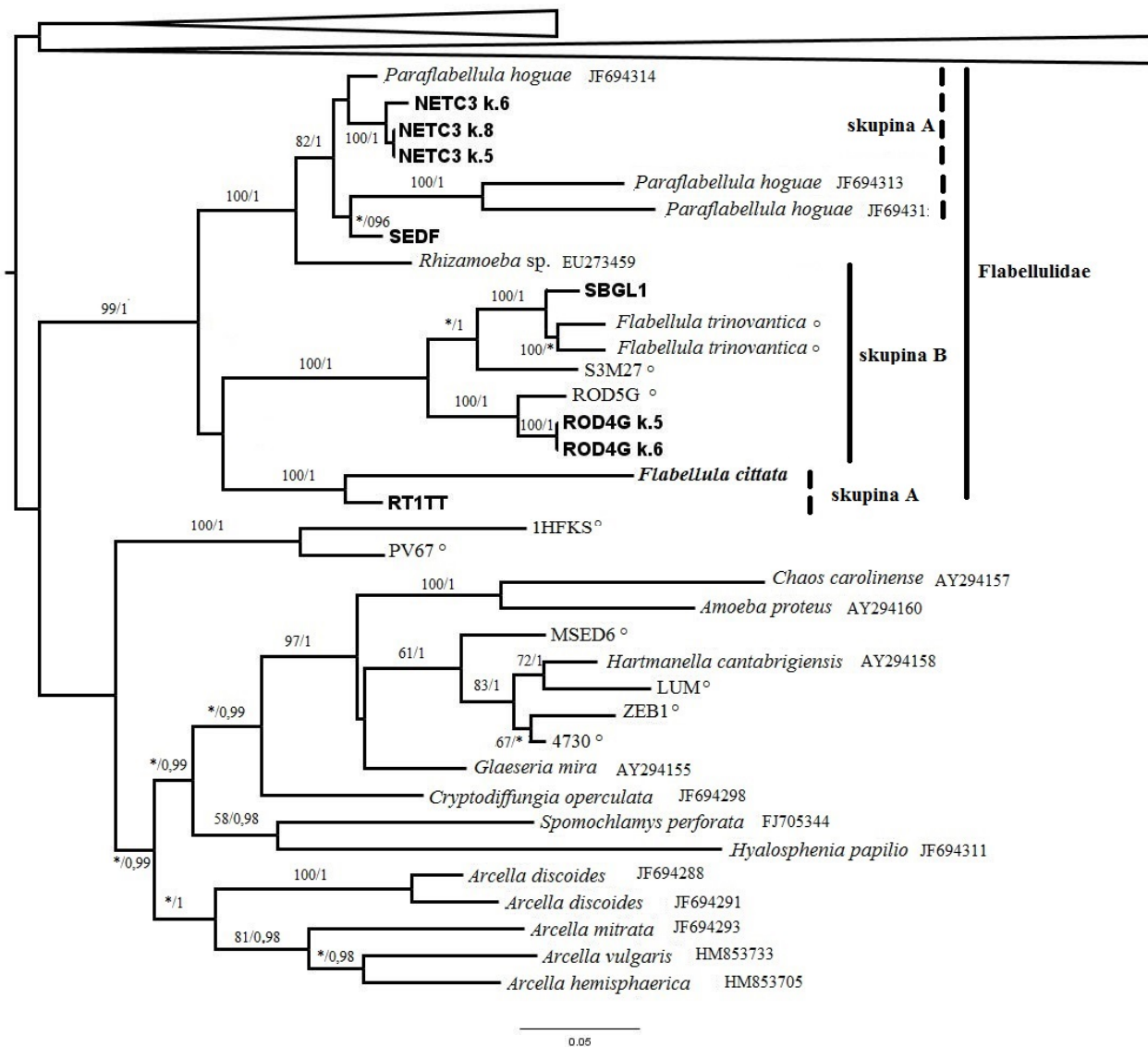
První fylogenetická analýza (Obr. 21) byla založena na genu pro SSU rRNA. Celkově jsem získala 3 sekvence (poskládané z 15 dílčích sekvencí) z kmenů DE49, DE50 a DE52. Mnou získané sekvence byly dále doplněny sekvencemi z databáze GenBank a také sekvencemi získanými Laboratoří rybí protistologie AV ČR. Ve fylogenetické analýze se studovaná skupina améb rozdělila na dvě nezávislé linie (A a B), jedna spadá do skupiny Leptomyxida (A), druhá (B) se řadí jako sesterská ke skupině Tubulinida.



Obr. 21: Fylogenetická analýza založená na sekvencích genu pro SSU rRNA s doplněnými posteriorními pravděpodobnostmi (0,9-1) vypočtenými pomocí BI a bootstrapovými podporami (50-100) vypočítanými pomocí ML (pokud nebylo dosaženo prahu pro BI (0,9) a pro ML (50) v jedné z hodnot, hodnota nahrazena symbolem hvězdičky). Sekvence získané Laboratoří rybí protistologie AV ČR označeny symbolem °. Získané sekvence označeny tučně. Kořen je lokalizován outgroupem – dalšími amébami. Ve fylogenetické analýze vyznačena studovaná skupina, linie A a B. Větve označené dvěma lomítky zkráceny o třetinu.

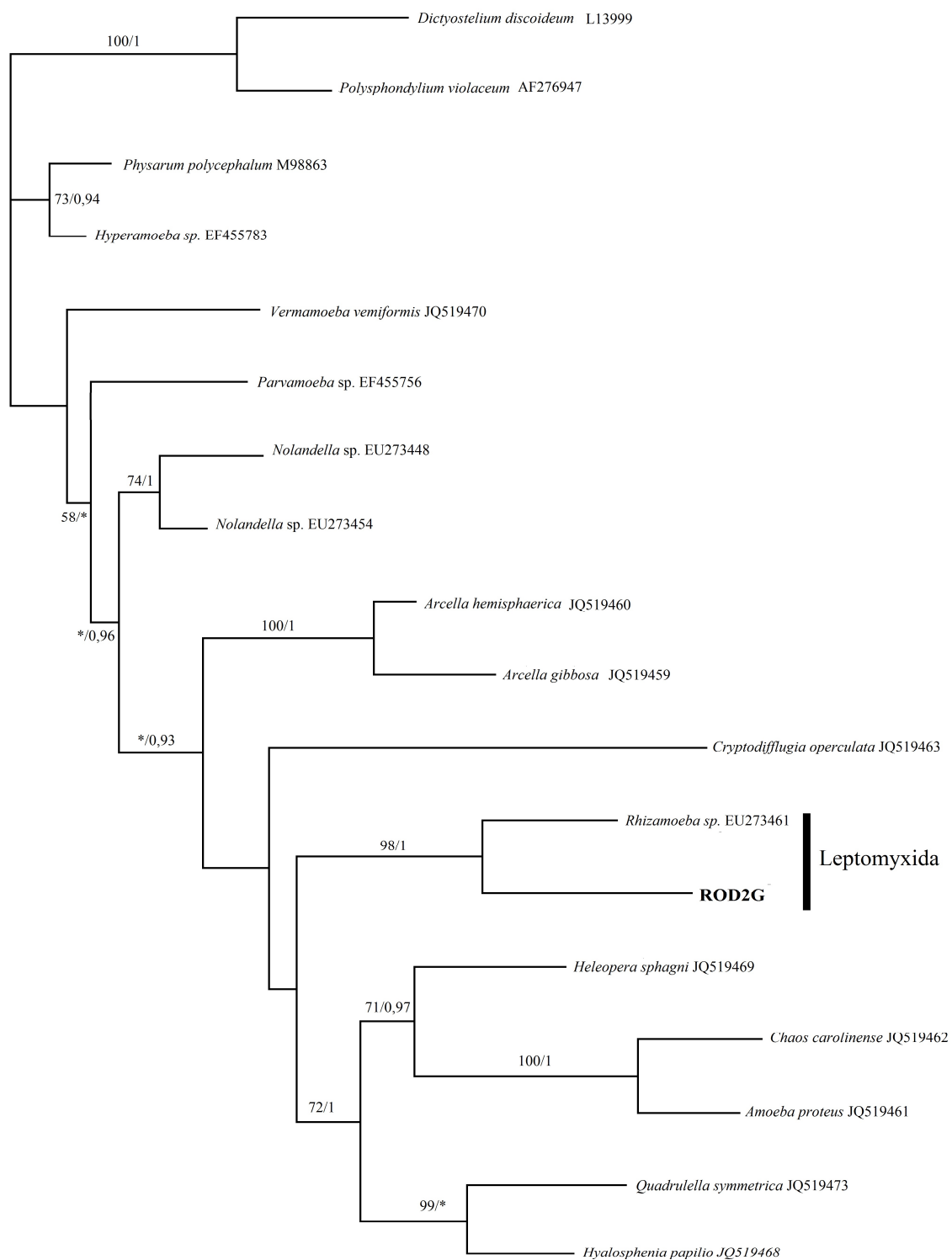


Do druhé fylogenetické analýzy (Obr. 22) byl zahrnut gen pro aktin. Tento gen je v rámci eukaryot univerzální a po genu pro SSU rRNA také velmi často ve fylogenetických analýzách využíváný. Z datasetu byla vytvořena fylogenetická analýza pomocí metody ML a BI, pro metodu ML byly použity také sekvence aminokyselin. Tři výsledné fylogenetické analýzy se lišily pouze bootstrapovou podporou a posteriorní pravděpodobností. Pro tuto analýzu bylo získáno 8 sekvencí vzorků NETC3, ROD4G, RT1TT, SBGL1 a *Flabellula citata*. Mnou získané sekvence spadají do monofyletické čeledi Flabellulidae.



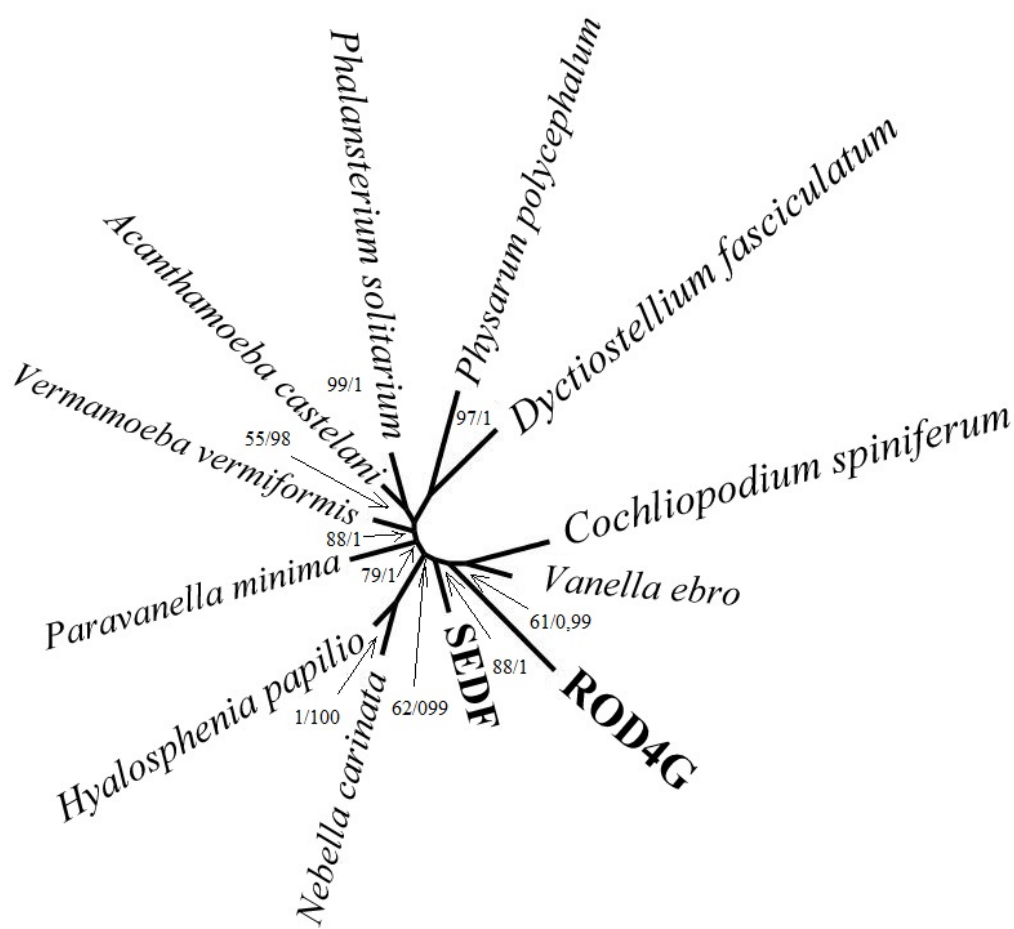
Obr. 22: Fylogenetická analýza založená na sekvencích genu pro aktin s doplněnými posteriorními pravděpodobnostmi (0,9-1) vypočtenými pomocí BI a bootstrapovými podporami (50-100) vypočtenými pomocí ML (pokud nedosažen práh pro BI (0,9) a pro ML (50) v jedné hodnotě, hodnota nahrazena symbolem hvězdičky). Sekvence získané Laboratoří rybí protistologie AV ČR označeny symbolem °, sekvence získané z databáze NCBI označeny příslušným kódem. Mnou získané sekvence vyznačeny tučně. Kořen lokalizován outgroupem – améby a další eukaryota, pro přehlednější nejsou uvedeny.

Do třetí fylogenetické analýzy byly zahrnuty sekvence genu pro  $\alpha$ -tubulin (Obr. 23). Mnou získaná sekvence je jediná (skupina B), ale byla doplněna sekvencemi z NCBI i o zástupce skupiny A. Mnou studovaný vzorek ROD2G spadá do skupiny Leptomyxida.



Obr. 23: Fylogenetická analýza založená na sekvencích genu pro  $\alpha$ -tubulin s doplněnými posteriorními pravděpodobnostmi (0,9-1) vypočtenými pomocí BI a bootstrapovými podporami (50-100) vypočtenými pomocí ML (pokud nedosažen práh pro BI (0,9) a pro ML (50) v jedné hodnotě, hodnota nahrazena symbolem hvězdičky). Sekvence získané AV ČR označeny symbolem °, sekvence získané z databáze NCBI označeny příslušným kódem. Kořen tvořen outgroupem (*Dictyostelium discoideum*, *Polysphondylium violaceum*, *Physarum polycephalum* a *Hyperamoeba* sp.). Mnou získaná sekvence vyznačena tučně.

Pro poslední analýzu (Obr. 24) byl vytvořen konkatenát ze sekvencí genu pro COX1, aktin a také SSU rDNA. Do této analýzy byly zahrnuty mnou získané sekvence aktinu a COX1 pro kmeny SEDF a ROD4G (vyznačeny tučně), které jsou doplněny o další sekvence z databáze NCBI (Tab. XV) a také o sekvence získané Laboratoří rybí protistologie AV ČR. Tato fylogenetická analýza není zakořeněna, ukazuje vztahy celé skupiny Amoebozoa. Byla vytvořena pomocí metody ML i BI. Studované vzorky tvoří dvě linie, které nejsou sesterské, ale blízko u sebe.



Obr. 24: Nezakořeněná fylogenetická analýza vzniklá na základě konkatenace sekvencí aktinových genů, COX1 genů a SSU rDNA s doplněnými posteriorními pravděpodobnostmi (0,9-1) vypočtený pomocí BI a bootstrapovými podporami (50-100) vypočtenými pomocí ML (pokud nedosažen práh pro BI (0,9) a pro ML (50) v jedné hodnotě, hodnota nahrazena symbolem hvězdičky). Sekvence získané Laboratoří rybí protistologie AV ČR označeny symbolem °, sekvence získané z databáze NCBI označeny příslušným kódem. Mnou získané sekvence vyznačeny tučně.

Tab. XV: Kódy sekvencí organismů z genové databanky použité v konkatenátu.

kód z genové banky	organismus	gen
V00002	<i>Acanthamoeba castelanii</i>	Aktin
JF298273	<i>Cochliopodium spiniferum</i>	Aktin
XM_004350668	<i>Dictyostelium fasciculatum</i>	Aktin
JQ519431	<i>Hyalosphenia papilio</i>	Aktin
JQ519446	<i>Nebela carinata</i>	Aktin
AY615871	<i>Phalansterium solitarium</i>	Aktin
KF895376	<i>Paravannella minima</i>	Aktin
X07792	<i>Physarum polycephalum</i>	Aktin
AY294151	<i>Vannella ebro</i>	Aktin
JQ519436	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	Aktin
U12386	<i>Acanthamoeba castelanii</i>	COX1
KC489470	<i>Cochliopodium</i> sp.	COX1
EU275727	<i>Dictyostelium fasciculatum</i>	COX1
JN849016	<i>Hyalosphenia papilio</i>	COX1
JN849033	<i>Nebela carinata</i>	COX1
KF895382	<i>Paravannella minima</i>	COX1
KC121006	<i>Phalansterium</i> sp.	COX1
L14769	<i>Physarum polycephalum</i>	COX1
GQ354166	<i>Vannella arabica</i>	COX1
GU828005	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	COX1
AF251938	<i>Acanthamoeba castelanii</i>	18S ribozomální gen
AY775130	<i>Cochliopodium spiniferum</i>	18S ribozomální gen
KC865594	<i>Dictyostelium fasciculatum</i>	18S ribozomální gen
EU852655	Flabellulidae sp. SEDF	18S ribozomální gen
JF694282	<i>Hyalosphenia papilio</i>	18S ribozomální gen
EU392143	<i>Nebela carinata</i>	18S ribozomální gen
KF895375	<i>Paravannella minima</i>	18S ribozomální gen
AF280078	<i>Phalansterium solitarium</i>	18S ribozomální gen
X13160	<i>Physarum polycephalum</i>	18S ribozomální gen
JQ519505	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	18S ribozomální gen
AY929906	<i>Vanella</i> sp.	18S ribozomální gen
data AV ČR	ROD4G	18S ribozomální gen

## 5 Diskuze

Flabellulidae je poměrně nenápadná čeleď v rámci skupiny Tubulinea. Není příliš mnoho literárních zdrojů, které se touto problematikou zabývají (např. Dyková *et al.*, 2008a; Page, 1983). Přesto existují podrobné popisy jejich morfologie (Bovee & Sawyer, 1979; Dyková *et al.*, 2008a; Page, 1983). Neexistuje však mnoho morfologických znaků (např. kvůli stálému polymorfismu améb), které by stoprocentně zaručily příslušnost ke studované čeledi. Tyto problémy lze vidět i v historii fylogenetického zařazení rodů do této malé skupiny, kdy byl do této čeledi chybně zařazován např. rod *Flamella* (Michel & Smirnov, 1999; Mrva, 2003; Page, 1983). Až po předložení nedávných fylogenetických analýz založených na genových sekvencích byl tento rod zcela vyloučen ze skupiny Flabellulidae (Cavalier-Smith *et al.*, 2015, Kudryavtsev *et al.*, 2009).

Dnešní molekulární fylogeneze je nejčastěji založena na sekvencích genu pro SSU rRNA, která je již z řady flabellulidních améb získána (Dyková *et al.*, 2008a; Kostka *et al.*, 2013), ale stále neposkytuje jasné výsledky. Ve studii Kostky a kolektivu (2013) tvoří studovaná čeleď dvě linie, jednu (A) spadající do skupiny Leptomyxida a druhou (B) spadající k rodům *Amoeba* a *Chaos*. Ale výsledky získané ze sekvencí jednoho genu nemusí určit přesné fylogenetické postavení, tento problém může být vyřešen analýzami založenými na větším počtu genů (řešeno např. v Baldauf *et al.*, 2000). Pro tuto studii byly vybrány další geny nejčastěji používané pro molekulární fylogenezi – **Aktin**,  **$\alpha$ -tubulin**, **COX1**, **Hsp90** a **elongační faktor-1 $\alpha$**  a také **SSU rDNA**, pokud nebyla u daného vzorku osekvenována. Byla snaha vybrat geny, které jsou známy pro širší škálu organismů, jsou v evoluci poměrně stálé, konzervované, a tak z jejich sekvencí lze snáze určit fylogenetické postavení a pomohou nám určit bližší fylogenetické vztahy studované skupiny. Např. aktin je velmi konzervovaný. Problémem je, že u některých skupin kmenu Amoebozoa může tvořit paralogy (Lahr *et al.*, 2011a). Na druhé straně např. v COX1 genu je u skupiny Amoebozoa velká variabilita a dají se rozlišit rozdíly i na nízké hierarchické úrovni.

### 5.1 Použité primery

V první části diskuze je třeba zhodnotit primery, které byly využívány pro amplifikaci jednotlivých proteinů a genů.

Pro COX1 gen byly použity HCO a LCO primery, které v tomto případě fungovaly. Žádný ze vzorků pro COX1 gen nebyl zaklonován. Kvalitní sekvence, které se povedlo získat během výzkumu, byly ze dvou kmenů – ROD4G a SEDF.

Pro aktinový protein byly používány pro přímou sekvenaci primery ActF a ActR a po zaklonování primery M13F a M13R, obě tyto kombinace se osvědčily. Ve většině případů se nemuselo klonovat, podařilo se celkově získat 8 aktinových sekvencí, které byly použity do fylogenetické analýzy.

Pro Hsp90 byla zkoušena kombinace primerů HspF1 a HspR1, HspF1 a HspR2. Ani jedna z těchto dvou kombinací nebyla shledána vhodnou, tedy nepovedlo se získat žádnou sekvenci, která by byla vhodná do fylogenetických analýz. Modifikací PCR byla znásobena šance pro získání kvalitních sekvencí, byla využita semi-nested PCR. Ale ani v tomto případě nebyly primery funkční. K další optimalizaci (gradientová PCR, design vhodnějších primerů) nebylo pro omezený časový rámec práce přikročeno.

Pro SSU rDNA bylo využito více primerů, pro amplifikace ERIB1 a ERIB0, tyto primery se osvědčily (také např. Dyková *et al.*, 2008a; Kostka *et al.*, 2013). Na sekvenaci vnitřní části byly využity další primery - 460F, 620F, 1200F, 1350R nebo 1700R (Dyková *et al.*, 2008a). Primer 1700R nebyl zvolen správně, protože ani při opětovném sekvenování se nepodařilo získat požadovanou sekvenci.

Pro amplifikaci genu pro elongační faktor  $1\alpha$  byly zkoušeny různé varianty primerů v kombinacích: 1. EF1F a EF10R, 2. EF2F a EF7R, 3. EF1F a EF10R, 4. EF2F a EF7R. Žádná z těchto kombinací se neukázala jako vhodná pro elongační faktor- $1\alpha$  čeledi Flabellulidae. Amplifikace genu proběhla nejdříve pomocí klasické PCR, která nepřinesla žádné výsledky, proto bylo přistoupeno k amplifikaci pomocí nested PCR. I když proužky na agarozové elektroforéze vycházely v požadované délce, nejčastěji se jednalo pouze o náhodné fragmenty. Bylo přistoupeno také ke klonování fragmentů, kde byla znásobená šance kladného výsledku, avšak bez úspěchu. Sekvence tohoto proteinu by mohly být předmětem dalšího výzkumu, mohly by dále posunout představy o fylogenezi studované skupiny.

Amplifikace genu pro  $\alpha$ -tubulin probíhala pomocí primerů  $\alpha$ -tubF1 a  $\alpha$ -tubR1 (dle Tekle *et al.*, 2007). Pomocí této kombinace se nedařilo požadované geny amplifikovat, s výjimkou vzorku ROD2G. Sekvence proteinu  $\alpha$ -tubulin mohou být bodem, který by se mohl rozvíjet v jiných ať už mých nebo cizích pracích, tedy hlavně nalezení vhodných primerů, které budou lépe fungovat v rámci této skupiny améb.

## 5.2 Fylogenetická analýza genu pro SSU rRNA

První analýza (Obr. 21 v bodě 4.4.3) je založena na genu pro rRNA malé ribozomální podjednotky. Jde o gen, na kterém je v dnešní době založeno velké množství fylogenetických

analýz. Analýza obsahuje 3 mnou získané sekvence, které byly složeny celkem z 15 dílčích sekvencí genu pro SSU rRNA – DE49, DE50 a DE52 (vyznačeny tučně). Tyto vzorky byly jednoznačně přiřazeny k čeledi Flabellulidae, jedná se o flabelluly ze skupiny A. Sekvence DE49 se zdá být velmi podobná sekvenci STAR2, DE50 M4M, a DE52 pak NETC3. Pravděpodobně se jedná o rod *Paraflabellula* ve všech třech případech.

Všechny studované sekvence flabellul, mnou získané i poskytnuté laboratoří, vytvořily dvě hlavní linie – skupinu A a skupinu B (označení z bodu 4.3). Tyto linie se zdají být velmi dobře odlišeny a skupina B má i velmi dobrou bootstrapovou podporu a podporu posteriorní pravděpodobnosti (100/1). Skupina A je pak podpořena zejména posteriorní pravděpodobností (0,97) a spadá do leptomyxidní větve, kam jsou Flabellulidae běžně řazeny a potvrzují to i mé fylogenetické analýzy založené na aktinu či  $\alpha$ -tubulinu (s tímto zařazením korespondují i další zdroje: Dyková *et al.*, 2008a, Smirnov *et al.*, 2011; Tekle *et al.*, 2008 nebo Watson *et al.*, 2014). Ale pozice skupiny B je nejistá, s nízkou podporou se umístila jako sesterská linie skupiny Tubulinida (Hartmanelidae, Amoebidae). Tato zvláštní větev obsahuje také dobře charakterizovaný druh *Flabellula trinovantica* (CCAP1529/4). Pokud by toto postavení bylo potvrzeno, mohlo by to znamenat, že se jedná o polyfyletickou skupinu (řešeno již také v Kostka *et al.*, 2013). Pokud by to dalšími geny potvrzeno nebylo, mohlo by to opět poukazovat na problém jednogenných analýz, které nemusí určit a často neurčují přesné postavení (viz např. v Baldauf *et al.*, 2000), byť se jedná o velmi často sekvenovaný a fylogeneticky hodnotný a uznávaný gen. Z tohoto důvodu se dnes často od fylogenetických analýz jednoho genu upouští (např. Cavalier-Smith *et al.*, 2015).

Do této fylogenetické analýzy byl také začleněn jeden vzorek rodu *Ripidomyxa*, který pochází z databáze NCBI. Tento rod však byl v 80. letech minulého století zrušen a jediný druh tohoto rodu pak přesunut do rodu *Rhizamoeba* (Page, 1988). V genové databance se nachází dvě částečné sekvence genu pro SSU rRNA označené jako rod *Ripidomyxa* (3. 4. 2015). Tato sekvence se dle očekávání zařadila do čeledi Leptomyxidae, do velké blízkosti k *Leptomyxa reticulata* (také Smirnov *et al.*, 2008). Spíše se jedná o vzorek rodu *Leptomyxa*, ale je třeba revize celé skupiny Leptomyxidae.

Do skupiny Flabellulidae jsou také zapleteny sekvence genu pro SSU rRNA patřící amébám označeným jako *Rhizamoeba* sp. (AF293901; EU273463) a *Rhizamoeba saxonica* (AY121847), pravděpodobně se jedná o chybně určené sekvence. Mohlo by se jednat o sekvence nějakého zástupce z čeledi Flabellulidae; pokud by druh či rod byl určen dobře, znamenalo by to, že čeleď Leptomyxidae je polyfyletická (problém s rodem *Rhizamoeba*. viz také např. Dyková *et al.*, 2008a, Tekle *et al.*, 2008 či Zettler *et al.*, 2000). Vzorek AF29390



(Zettler *et al.*, 2000) a vzorek EU273463 (Tekle *et al.*, 2008) *Rhizamoeba* sp. a *Rhizamoeba saxonica* (AY121847) jsou i dle NCBI řazeny do skupiny Flabellulidae.

Rod *Saccamoeba* ze skupiny Hartmanellidae v mnoha pracích (např. Bolivar *et al.*, 2001; Cavalier-Smith, 2004; Lahr *et al.*, 2013; Pawlowski & Burki, 2009; Smirnov *et al.*, 2005) vybočuje a netvoří s dalšími rody z této skupiny jednu linii. Nedávno byla část tohoto rodu vyčleněna jako rod *Ptolemeba* (Watson *et al.*, 2014). V mé fylogenetické analýze podle genu pro SSU rRNA *Saccamoeba* jednu linii tvoří a to s velmi vysokou bootstrapovou podporou i s podporou posteriorní pravděpodobnosti (99/1) a zapadá do linie Hartmanellidae (také Dyková *et al.*, 2008b), tedy pod podmínkou vyčlenění rodu *Ptolemeba* (Watson *et al.*, 2014). Pak by asi bylo vhodné definovat také samostatnou monofyletickou skupinu (pravděpodobně čeleď) pro ptolemebu (jinak zůstávají Hartmanellidae stále parafyletické), ale tento fakt je prozatím v literatuře opomíjen.

Dalším problematickým zástupcem se zdá být druh *Parvamoeba rugata*, který je řazen do skupiny Ameobozoa, Lobosa, Discosea, Flabellinia, Himatizmenida, Parvamoebida (Smirnov *et al.*, 2011), zařazení do skupiny Amoebozoa, Lobosa, Discosea potvrzují další zdroje (např. Corsaro & Venditti, 2013). V některých pracích byl jiný druh stejného rodu (*Parvamoeba monoura*) řazen jako *incertae sedis* (Tekle *et al.*, 2008) nebo stavěn na úplnou bázi skupiny Tubulinea (např. Cole *et al.*, 2010). V mé SSU rRNA analýze se sekvence druhu *Parvamoeba rugata* umístila do skupiny Amoebozoa, Lobosa, Tubulinea s velmi dobrou bootstrapovou podporou i posteriorní pravděpodobností (89/0,96). Tyto améby ale nemají žádnou nalezenou synapomorfii se skupinou Tubulinea. Nabízí se dvě možnosti – buď se skutečně jedná o bazální skupinu tubulineí a nebyla nalezena synapomorfie, a nebo je to skupina blízce příbuzná Tubulinea (Cole *et al.*, 2008). Případně se může jednat o fylogenetický artefakt.

### 5.3 Fylogenetická analýza genu pro aktin

Na dataset vytvořený pro aktinový gen (Obr. 22 v bodě 4.4.3) byla využita metoda ML a BI pro nukleotidy a metoda ML pro aminokyseliny. Všechny tyto analýzy vedou pouze k jiným podporám jednotlivých větví, ale topologické vztahy relevantní pro mou studii v rámci skupiny Tubulinea se téměř nemění. Tato fylogenetická analýza podporuje postavení čeledi Flabellulidae ve skupině Leptomyxida s velmi vysokými hodnotami bootstrapové podpory (100) a posteriorní pravděpodobnosti (1) (Kostka *et al.*, 2013). Tato analýza podporuje blízkou příbuznost skupiny A a B (označení z bodu 4.3) a nepodporuje teorii o polyfylii studované čeledi (Kostka *et al.*, 2013). V této analýze vznikají v čeledi

Flabellulidae tři skupiny. Skupina B spadá do jedné linie, skupina A je rozdělena do dvou skupin (A1 a A2) (viz odst. 5.4).

Gen aktinu ve vzorku EU273459 s názvem *Rhizamoeba* sp. (Tekle *et al.*, 2008) se zdá být špatně určen (podobný problém se stejným organismem ale u jiného genu – viz Dyková *et al.*, 2008a nebo bod 5.2). V mé analýze vzorek s určením *Rhizamoeba* sp. vychází dovnitř skupiny Flabellulidae, přitom by měl spadat do čeledi Leptomyxidae. Linie Leptomyxidae sice není v analýze reprezentována žádnou další sekvencí, přesto by *Rhizamoeba* sp. měla být sesterská k flabellulidům, ne jejich členem. Podle mé fylogenetické analýzy se zdá, že je buď rod *Rhizamoeba* polyfyletický, nebo vzorek EU273459 špatně pojmenován.

Ze vzorku NETC3 bylo získáno několik klonů a všechny spadají do rodu *Paraflabellula* (také Dyková *et al.*, 2008a), stejně tak kmen SEDF.

Skupina Arcelinida v této analýze nespadá do jedné linie a není tedy podle aktinové analýzy monofyletická (např. Lahr *et al.*, 2013). Již starší zdroje uvádí, že by se mohlo jednat o uměle vytvořenou skupinu, její druhová diverzita je opravdu veliká, ale není známo velké množství sekvencí (např. Lara *et al.*, 2008). Polyfylie v mé aktinové analýze je dána sekvencí druhu *Cryptodiffugia operculata*, který se řadí do příbuznosti ke skupině s rody *Chaos* a *Amoeba*. Oproti tomu např. gen SSU rRNA se spíše přiklání k monofylii skupiny i s problematickým rodem v mé analýze (Gomaa *et al.*, 2012).

#### 5.4 Fylogenetická analýza genu pro $\alpha$ -tubulin

Třetí analýza (Obr. 23 v bodě 4.4.3) vytvořená z genu pro  $\alpha$ -tubulin pomocí ML i BI sice obsahuje pouze jedinou mnou získanou sekvenci, ale právě tento vzorek pochází ze skupiny B – flabelluly sedící podle SSU rDNA analýzy (Kostka *et al.*, 2013) mimo původní postavení (tedy u rodu *Chaos* a *Amoeba*). Celý tento strom opět vyvrací polyfylii (Kostka *et al.*, 2013), získaná sekvence je sesterská k čeledi Leptomyxidae k rodu *Rhizamoeba* a s jasnou bootstrapovou podporou (96) a podporou posteriorní pravděpodobnosti (1) spadá do skupiny Leptomyxida. O dalších vztazích v rámci studované čeledi nelze nic říci z důvodu získání pouze jedné sekvence.

Opět je podpořena polyfylie skupiny Arcellinida z důvodu postavení druhu *Cryptodiffugia operculata* či *Hyalosphenia papilio* mimo skupinu (např. Lahr *et al.*, 2013), oproti např. genu SSU rRNA, který spíše potvrzuje monofylii (Gomaa *et al.*, 2012).

## 5.5 Fylogenetická analýza - konkatenát

Poslední fylogenetická analýza, která je založena na více genech (COX1, aktin a SSU rDNA – Obr. 24 v bodě 4.4.3), širěji zařazuje vzorky flabellul do skupiny Amoebozoa. Je zastoupen jak vzorek ze skupiny A (SEDF), tak vzorek ze skupiny B (ROD4G). Analýzy složené z proteinových genů tyto dvě skupiny dávají dohromady s velmi vysokou bootstrapovou podporou i posteriorní pravděpodobností. Analýza genu pro SSU rRNA jednu ze skupin (skupina B) řadila mimo skupinu Leptomyxida do příbuznosti k rodům *Chaos* a *Amoeba*. Konkatenát vytvořený ze tří genů ukazuje, že skupiny neleží ve velké vzdálenosti, jak naznačovala analýza genu pro SSU rRNA, ale na druhou stranu ani nejsou sesterské. Tato analýza naznačuje, že je třeba více genů pro přesné stanovení představy o fylogenezi flabellulidních améb. Tedy možná se nebude jednat pouze o jednu „čeleď“, ale o dvě skupiny v rámci molekulární fylogeneze blízko u sebe, ale na druhou stranu tři geny jsou stále poměrně málo. Odloučení těchto dvou skupin od sebe může být stále dáno jediným vybočujícím genem pro SSU rRNA a relativně krátké proteinové geny pak nejsou schopny převážit signál na „svoji“ stranu.

## 5.6 Fylogenetická analýza založená na genech pro COX1

V průběhu práce byla také provedena fylogenetická analýza založená na sekvencích genu pro COX1. Tento gen je poměrně variabilní a používá se zejména pro rozlišení malých rozdílů i na nízké hierarchické úrovni. Pro mou analýzu byly získány 4 sekvence ze dvou vzorků – ROD4G a SEDF, lze je tedy použít pouze pro analýzu na vyšší hierarchické úrovni (další sekvence se ani v NCBI nenachází). Tato analýza sice vznikla, ale nevede k dobře rozlišenému stromu: bootstrapová podpora větví je nízká.

## 5.7 „Rody“ studované skupiny Flabellulidae

V další části bych se chtěla věnovat monofylii a polyfylii rodů *Flabellula* a *Paraflabellula*, které se v některých analýzách zdají být parafyletické či polyfyletické, často promíchány ještě s rodem *Rhizamoeba* (Dyková *et al.*, 2008a; Kostka *et al.*, 2013 a Tekle *et al.*, 2008). V některých pracích se zdají být monofyletické (Dyková *et al.*, 2008b) – v této práci to může být dáno malým množstvím vzorků.

Morfologicky jsou rody odlišeny takto: rod *Flabellula* má trojúhelníkovité trofozoity s dobře vyvinutou přední hyaloplazmou (Dyková *et al.*, 2008a), pohybuje se pomocí panožek bez subpseudopodií (Page, 1983). Rod *Paraflabellula* je pak popsán jako rod, který se pohybuje pomocí panožek s krátkými nerozvětvenými subpseudopodiemi z hyalinní zóny

(Page, 1983).

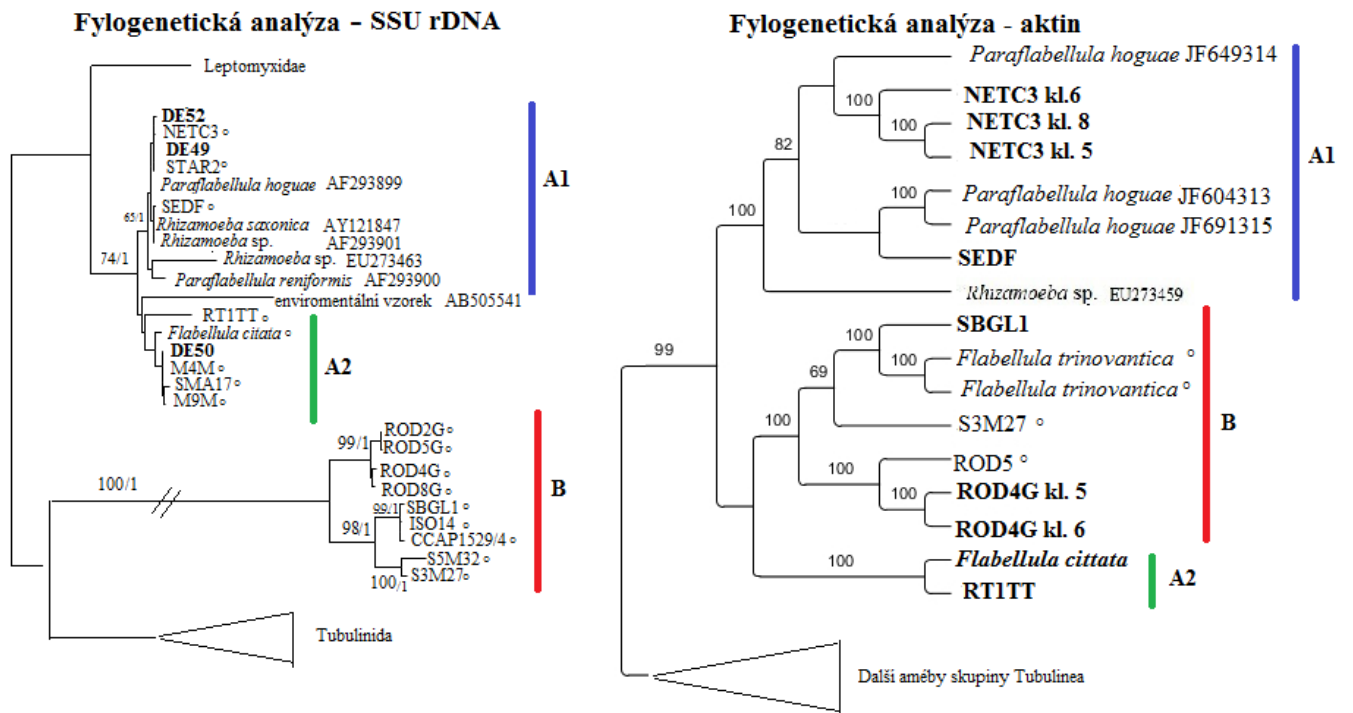
Pro porovnání fylogenetických vztahů rodu *Paraflabellula* a *Flabellula* mohou sloužit mnou vytvořené analýzy genu pro SSU rRNA a také analýza aktinových genů. V mých analýzách vznikají tři odlišené linie (pro ilustraci Obr. 25 – požadované části fylogenetických analýz). Skupina B zůstala zachována a skupina A (opět původní označení z bodu 4.3) se rozpadlá na dvě linie – skupina A1 a A2.

Jedna z linií (červená – skupina B) je tvořena kmeny ROD4G, ROD5G, ROD8G, SBGL1, *Flabellula trinovantica* (CCAP1529/4), SBGL1, S3M27 a S3M32. Tato skupina je jasně podepřena bootstrapovou podporou i posteriorní pravděpodobností v obou analýzách. Jen stále není jasné, kam tuto celou linii zařadit, zda patří do skupiny Flabellulidae (dle analýzy aktinového a  $\alpha$ -tubulinového genu, Dyková *et al.*, 2008a; Dyková *et al.*, 2008b; Tekle *et al.*, 2008) či k rodům *Chaos* a *Amoeba* (analýza SSU rDNA, Kostka *et al.*, 2013).

Druhá linie (zelená – skupina A2) zahrnuje druhy a kmeny *Flabellula citata* a RT1TT, M4M, M9M a SMA17. Tato skupina je velmi dobře podpořena bootstrapovou hodnotou (100) fylogenetické analýzy pro aktin (také Kostka *et al.*, 2013). Ve fylogenetické analýze SSU rDNA tato linie také vzniká, ale není příliš dobře podpořena.

Třetí linie (modrá – skupina A1) pak dává dohromady zejména druhy rodu *Paraflabellula* – *Paraflabellula hoguae*, NETC3, STAR2, SEDF a přiřazuje pravděpodobně špatně určenou sekvenci rodu *Rhizamoeba*. Tato linie má střední až vyšší hodnotu podpory bootstrapu a vysokou hodnotu posteriorní pravděpodobnosti. Vzorek NETC3 je vzorkem rodu *Paraflabellula* (také Dyková *et al.*, 2008a). Vzorek SEDF se podobá trofozoitům rodu *Flamella*, ale k tomuto rodu nepatří (Dyková *et al.*, 2008a), v mých analýzách spadá do rodu *Paraflabellula*. Obě tyto fylogenetické analýzy, jak aktinu tak SSU rDNA, korespondují s morfologickým určením rodu *Paraflabellula*.

Morfologicky jsou rozlišitelné rody *Flabellula* a *Paraflabellula*. Rod *Paraflabellula* zůstává v mých analýzách zachován s vyšší až střední hodnotou podpory. Rod *Flabellula* tvoří dvě linie – minimálně analýza aktinu utváří velmi vysokou podporu pro tyto dvě linie a v analýze genu pro SSU rRNA vycházejí ve stejném složení, i když s nižší podporou.



Obr. 25: Ilustrativní části fylogenetických analýz týkající se rodů studované čeledi.

## 6 Závěr

Čeď Flabellulidae je zajímavou skupinou komenzálních, možná až parazitických améb. Cílem této práce bylo získat nové sekvence určitých genů této čeledi. Povedlo se získat dohromady 36 kvalitních sekvencí (sestavených do 14 výsledných) nejčastěji genu pro aktinový protein, gen pro SSU rRNA, ale také pro COX1 a  $\alpha$ -tubulin. Tato práce obohatila nynější sbírku genových sekvencí a pomohla blíže specifikovat postavení studované skupiny améb.

- I když byly objeveny a získány nové sekvence, které mají značnou vypovídací hodnotu o celé čeledi Flabellulidae, nebyla zcela objasněna jejich fylogeneze na molekulární úrovni. Je třeba získat další sekvence např. EF nebo Hsp.
- Skupina pravděpodobně tvoří tři molekulárně dobře odlišené linie. Morfologicky určený rod *Paraflabellula* koresponduje s fylogenetickými analýzami pro aktin a pro SSU rDNA.
- Vzorky NETC3, STAR2 a SEDF byly přiřazeny k rodu *Paraflabellula*.
- Vzorky DE49, DE50, DE52 byly přiřazeny k čeledi Flabellulidae.
- Vzorek DE49 a DE52 byl přiřazen k rodu *Paraflabellula*.
- Výsledky mé práce ukazují, že nulovou hypotézu stanovenou před jejím započítím (Flabellulidae jsou monofyletickou skupinou) nelze vyvrátit; většina molekulární dat poukazuje naopak na monofylii čeledi Flabellulidae s tím, že sekvence SSU rDNA jsou u některých jejích zástupců aberantní.
- Je třeba revize rodu *Rhizamoeba*. Vzorky AF293901; EU273463; EU273459 s označením *Rhizamoeba* sp. a vzorek AY121847 s označením *Rhizamoeba saxonica* se zdají být buď chybně určené, pojmenované (pravděpodobně čeď Flabellulidae) nebo je rod *Rhizamoeba* polyfyletický.

## 7 Zkratky

AV ČR – Akademie Věd České republiky

BI – Bayesovská interference

Bp – base pair

COX1 – podjednotka I cytochrom c oxidázy

dNTP – nucleoside triphosphates

EF – elongační faktor

F primer – forward primer

Hsp – heat shock protein

ML – Maximum Likelihood

NCBI – National Center for Biotechnology Information

Normanski DIC – diferenciální interferenční kontrast

PCR – polymerázová řetězcová reakce

R primer – reverse primer

SSU rDNA, gen pro SSU rRNA – malá ribozomální podjednotka

TAE pufr – tris-acetátový pufr

Taq polymeráza – Polymeráza syntetická, název od bakterie *Thermus aquaticus*

UV – ultrafialové záření

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid

## 8 Zdroje

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W. & Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52, 399-451.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2013). *Essential cell biology*. New York: Garland Science.

Atlan, D., Coupat-Goutaland, B., Risler, A., Reyrolle, M., Souchon, M., Briolay, J., Jarraud, S., Doublet, P., & Pélandakis, M. (2012). *Micriamoeba tesseris* nov. gen. nov. sp.: a new taxon of free-living small-sized Amoebae non-permissive to virulent Legionellae. *Protist*, 163, 888-902.

Baldauf, S. L., & Doolittle, W. F. (1997). Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 12007-12012.

Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I., & Doolittle, W. F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 290, 972-977.

Bárta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., Dashkevicz, M., Anderson, J. W., Feighner, S. D., Elbrecht, A., Jenkins, M.C., Perkins-Barrow, A., Ruff, M. D., Danforth, H. D., & Profous-Juchelka, H. (1997). Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of parasitology*, 83, 262-271.

Bartlett, J., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology*, 226, 3-6.

Baumgartner, M., Yapi, A., Gröbner-Ferreira, R., & Stetter, K. O. (2003). Cultivation and properties of *Echinamoeba thermarum* n. sp., an extremely thermophilic amoeba thriving in hot springs. *Extremophiles*, 7, 267-274.

Beneš, K.(1997). *Úvod do biologie buňky*. České Budějovice: JU.



- Berger, J. (2000). *Biologie buněk*. České Budějovice: KOPP.
- Bolivar, I., Fahrni, J. F., Smirnov, A., & Pawlowski, J. (2001). SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited. *Molecular Biology and Evolution*, *18*, 2306-2314.
- Bovee, E. C. (1970). The lobose amebas. I. A key to the suborder Conopodina Bovee and Jahn, 1966 and descriptions of thirteen new and little known *Mayorella* species. *Arch Protistenkd*, *112*, 178-227.
- Bovee, E. C. & Sawyer, T. K. (1979). *Marine flora and fauna of the northeastern United States. Protozoa; Sarcodina; amoebae*. Seattle: National Marine Fisheries Service.
- Brown, M. W., Silberman, J. D., & Spiegel, F. W. (2011). "Slime molds" among the Tubulinea (Amoebozoa): molecular systematics and taxonomy of *Copromyxa*. *Protist*, *162*, 277-287.
- Butler, H., & Rogerson, A. (1996). Growth potential, production efficiency and annual production of marine benthic naked amoebae (gymnamoebae) inhabiting sediments of the Clyde Sea area, Scotland. *Aquatic Microbial Ecology*, *10*, 123-129.
- Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society of London-B*, *271*, 1251-1262.
- Cavalier-Smith, T. (2010). Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biology Letters*, *6*, 342-345.
- Cavalier-Smith, T. (2013). Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. *European journal of protistology*, *49*, 115-178.
- Cavalier-Smith, T., Fiore-Donno, A. M., Chao, E., Kudryavtsev, A., Berney, C., Snell, E. A., & Lewis, R. (2015). Multigene phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa. *Molecular phylogenetics and evolution*, *83*, 293-304.
- Cavalier-Smith, T., & Chao, E. E. (1998). Hyperamoeba rRNA phylogeny and the classification of the phylum. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *46*, 5A.

- Cole, J., Anderson, O. R., Tekle, Y. I., Grant, J., Katz, L. A., & Nerad, T. (2010). A description of a new “Amoebozoan” isolated from the American lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *57*, 40-47.
- Corsaro, D., & Venditti, D. (2013). Molecular Phylogenetics Evidence for a Novel Lineage of Amoebae Within Discosea (Amoebozoa: Lobosa). *Acta Protozoologica*, *52*.
- Dyková, I., Fiala, I., Pecková, H., & Dvorakova, H. (2008a). Phylogeny of Flabellulidae (Amoebozoa: Leptomyxida) inferred from SSU rDNA sequences of the type strain of *Flabellula citata* Schaeffer, 1926 and newly isolated strains of marine amoebae. *Folia Parasitologica (Prague)*, *55*, 256.
- Dyková, I., Kostka, M. & Pecková, H. (2008b). Morphology and SSU rDNA-based phylogeny of a new strain of *Saccamoeba* sp. (*Saccamoeba* Frenzel, 1892, Amoebozoa). *Acta Protozoologica*, *47*, 397–405.
- Dyková, I., & Kostka, M. (2013). *Illustrated Guide to Culture Collection of Free-living Amoebae*. Praha: Academia.
- Fahrni, J. F., Bolivar, I., Berney, C., Nassonova, E., Smirnov, A., & Pawlowski, J. (2003). Phylogeny of lobose amoebae based on actin and small-subunit ribosomal RNA genes. *Molecular biology and evolution*, *20*, 1881-1886.
- Fenchel, T. (2010). The life history of *Flabellula baltica* Smirnov (Gymnamoebae, Rhizopoda): adaptations to a spatially and temporally heterogeneous environment. *Protist*, *161*, 279-287.
- Fishbeck, D. W., & Bovee, E. C. (1993). Two new amoebae, *Striamoeba sparolata* n. sp. and *Flamella tiara* n. sp., from fresh water. *Ohio Journal of Science*, *93*, 134-139.
- Fouque, E., Trouilhé, M. C., Thomas, V., Humeau, P., & Héchard, Y. (2014). Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: effects of environmental conditions and cell concentration. *Experimental parasitology*, *145*, S62-S68.
- Gomaa, F., Todorov, M., Heger, T. J., Mitchell, E. A., & Lara, E. (2012). SSU rRNA phylogeny of Arcellinida (Amoebozoa) reveals that the largest Arcellinid genus, *Diffflugia* Leclerc 1815, is not monophyletic. *Protist*, *163*, 389-399.

- Guillen, N., Boquet, P., & Sansonetti, P. (1998). The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Journal of cell science*, *111*, 1729-1739.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, *41*, 95-98.
- Hausmann, K., & Hülsmann, N. (2003). *Protozoologie*. Praha: Academia.
- Hopkins, D. L. (1937). The relation between food, the rate of locomotion and reproduction in the marine amoeba, *Flabellula mira*. *Biological Bulletin*, *72*, 334-343.
- Chakraborty, S., & Pussard, M. (1985). *Ripidomyxa australiensis* nov. gen. nov. sp., a mycophagous amoeba from Australian soil. *Protistologica*, *21*, 133-140.
- Koolman, J., & Röhm, K. H. (2012). *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada Publishing(4).
- Kostka, M., Tým, T., Pecková, H., & Dyková, I. (2013, July). Is *Flabellula* polyphyletic? Poster session presented at 15th International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae, FLAM 2013, Vienna.
- Kudryavtsev, A., Wylezich, C., Schlegel, M., Walochnik, J., & Michel, R. (2009). Ultrastructure, SSU rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of *Flamella* Schaeffer, 1926 (Amoebozoa), with description of three new species. *Protist*, *160*, 21-40.
- Lahr, D. J., Nguyen, T. B., Barbero, E., & Katz, L. A. (2011a). Evolution of the actin gene family in testate lobose amoebae (Arcellinida) is characterized by two distinct clades of paralogs and recent independent expansions. *Molecular biology and evolution*, *28*, 223-236.
- Lahr, D. J., Grant, J., Nguyen, T., Lin, J. H., & Katz, L. A. (2011b). Comprehensive phylogenetic reconstruction of amoebozoa based on concatenated analyses of SSU-rDNA and actin genes. *PLoS One*, *6*, e22780.
- Lahr, D. J., Grant, J. R., & Katz, L. A. (2013). Multigene phylogenetic reconstruction of the Tubulinea (Amoebozoa) corroborates four of the six major lineages, while additionally revealing that shell composition does not predict phylogeny in the Arcellinida. *Protist*, *164*, 323-339.

- Lara, E., Heger, T. J., Ekelund, F., Lamentowicz, M., & Mitchell, E. A. (2008). Ribosomal RNA genes challenge the monophyly of the Hyalospheniidae (Amoebozoa: Arcellinida). *Protist*, *159*, 165-176.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, *23*, 2947-2948.
- Letková, V., Goldová, M., & Kočíšová, A. (2010). *Základy protozoologie*. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciách.
- Michel, R., & Smirnov, A. V. (1999). The genus *Flamella* Schaeffer, 1926 (Lobosea, Gymnamoebia), with description of two new species. *European Journal of Protistology*, *35*, 403-410.
- Mrva, M. (2003). Notes on active gymnamoebae (Rhizopoda, Gymnamoebia) in Turiec river. *Folia Faunistica Slovaca*, *8*, 23-26.
- Nikolaev, S. I., Mitchell, E. A., Petrov, N. B., Berney, C., Fahrni, J., & Pawlowski, J. (2005). The testate lobose amoebae (order Arcellinida Kent, 1880) finally find their home within Amoebozoa. *Protist*, *156*, 191-202.
- Page, F. C. (1972). *Rhizamoeba polyura* ng, n. sp., and uroidal structures as a taxonomic criterion for amoebae. *Transactions of the American Microscopical Society*, *91*, 502-513.
- Page, F. C. (1983). *Marine gymnamoebae*. Cambridge: Institute of Terrestrial Ecology.
- Page, F. C. (1988). *A new key to freshwater and soil Gymnamoebae: with instructions for culture*. Ambleside: Freshwater Biological Association.
- Page, R. D. (1996). TreeView. An application to display phylogenetic trees on personal computer. *Comp Appl Biol Sci*, *12*, 357-358.

Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A. M., Gile, G., Holzmann, M., Jahn, R., Jirků, M., Keeling, P.J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., Lukeš, J., Mann, D.G., Mitchell, E.A.D., Nitsche, F., Romeralo, M., Saunders, G., Simpson, A.G. B., Smirnov, A., Spouge, J., Stern, R., Stoeck, T., Zimmermann, J., Schindel, D., & de Vargas, C. (2012). CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS biology*, 10, e1001419.

Pawlowski, J., & Burki, F. (2009). Untangling the Phylogeny of Amoeboid Protists1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56, 16-25.

Rebanová, V. (1998). *Protozoologie*. České Budějovice: Zemědělská fakulta Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích.

Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.

Schaeffer, A. A. (1926). *Taxonomy of the Amebas: with descriptions of thirty-nine new marine and freshwater species*. Washington: Carnegie Institution of Washington.

Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M. A., Cavalier-Smith, T., Nedreklepp, J. M., Klaveness, D., & Jakobsen, K. S. (2006). Combined heat shock protein 90 and ribosomal RNA sequence phylogeny supports multiple replacements of dinoflagellate plastids. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 53, 217.

Singh, B. N. (1945). The selection of bacterial food by soil amoebae, and the toxic effects of bacterial pigments and other products on soil protozoa. *British journal of experimental pathology*, 26, 316.

Singh, B. N. (1948). Studies on Giant Amoeboid Organisms 2. Nuclear Division and Cyst Formation in *Leptomyxa reticulata* Goodey with Remarks on the Systematic Position of the Organism. *Journal of General Microbiology*, 2, 89-96.

Singh, B. N., & Hanumaiah, V. (1979). Studies on pathogenic and non-pathogenic amoebae and the bearing of nuclear division and locomotive form and behaviour on the classification of the order Amoebida. *Indian Journal of Microbiology*, 1, 1-80.

- Smirnov, A. V., & Goodkov, A. V. (1999). An illustrated list of basic morphotypes of Gymnamoebia (Rhizopoda, Lobosea). *Protistology*, 1, 20-29.
- Smirnov, A. V., & Brown, S. (2004). Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology*, 3, 148-190.
- Smirnov, A., Nasonova, E., Berney, C., Fahrni, J., Bolivar, I., & Pawlowski, J. (2005). Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protist*, 156, 129-142.
- Smirnov, A. V., Nasonova, E. S., & Cavalier-Smith, T. (2008). Correct identification of species makes the amoebozoan rRNA tree congruent with morphology for the order Leptomyxida Page 1987; with description of *Acramoeba dendroidea* ng, n. sp., originally misidentified as 'Gephyramoeba sp.'. *European journal of protistology*, 44, 35-44.
- Smirnov, A., Nasonova, E., Fahrni, J., & Pawlowski, J. (2009). Rhizamoeba neglecta n. sp. (Amoebozoa, Tubulinea) from the bottom sediments of freshwater Lake Leshevoe (Valamo Island, North-Western Russia), with notes on the phylogeny of the order Leptomyxida. *European journal of protistology*, 45, 251-259.
- Smirnov, A. V., Chao, E., Nasonova, E. S., & Cavalier-Smith, T. (2011). A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist*, 162, 545-570.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688-2690.
- Tekle, Y. I., Grant, J., Cole, J. C., Nerad, T. A., Anderson, O. R., Patterson, D. J., & Katz, L. A. (2007). A multigene analysis of *Corallomyxa tenera* sp. nov. suggests its membership in a clade that includes Gromia, Haplosporidia and Foraminifera. *Protist*, 158, 457-472.
- Tekle, Y. I., Grant, J., Anderson, O. R., Nerad, T. A., Cole, J. C., Patterson, D. J., & Katz, L. A. (2008). Phylogenetic placement of diverse amoebae inferred from multigene analyses and assessment of clade stability within 'Amoebozoa' upon removal of varying rate classes of SSU-rDNA. *Molecular phylogenetics and evolution*, 47, 339-352.
- Volf, P., & Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton.

Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3, 294-299.

Watson, P. M., Sorrell, S. C., & Brown, M. W. (2014). *Ptolemeba* n. gen., a Novel Genus of Hartmannellid Amoebae (Tubulinea, Amoebozoa); with an Emphasis on the Taxonomy of Saccamoeba. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61, 611-619.

Zettler, L. A. A., Nerad, T. A., O'Kelly, C. J., Peglar, M. T., Gillevet, P. M., Silberman, J. D., & Sogin, M. L. (2000). A molecular reassessment of the leptomyxid amoebae. *Protist*, 151, 275-282.