

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Améby skupiny Euamoebida (Amoebozoa,  
Tubulinea): Vývoj názorů na jejich taxonomii a  
fylogenezi**

Bakalářská práce

**Simona Šolková**

Školitel: Mgr. Martin Kostka, Ph.D.

České Budějovice 2015

Školková, S. (2015): Améby skupiny Euamoebida (Amoebozoa, Tubulinea): Vývoj názorů na jejich taxonomii a fylogenezi. [Amoebas of the group Euamoebida (Amoebozoa, Tubulinea): Development of opinions on the taxonomy and phylogeny. Bc. Thesis, in Czech.] – 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

### **Annotation**

The study was focused on amoebas of the group Euamoebida (Amoebozoa, Tubulinea). This study attempts to clarify their taxonomy and development of opinions on their phylogeny. It also focuses on changes of naming of individual taxa, which occurred during their research. Several other topics (cellular morphology of Amoebozoa, their ecology, characteristics of the families Hartmannellidae and Amoebidae and also relationships between families) are also discussed in this thesis.

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 26. 11. 2015

Simona Školková

## **Poděkování**

Tímto bych velice ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Martinu Kostkovi, Ph.D. za jeho trpělivost, cenné rady, odborné vedení a ochotu, kterou projevoval po celou dobu vedení bakalářské práce. Dále bych poděkovala Laboratoři rybí protistologie Parazitologického ústavu AV ČR za poskytnutí sekvencí.

Velký dík patří mé rodině, s jejichž pomocí jsem mohla studovat a byli mi vždy oporou během mého studia.

# OBSAH

1	CÍLE PRÁCE .....	1
2	ÚVOD .....	2
2.1	Základní charakteristika amoebozoí .....	2
2.2	Buněčná morfologie amoebozoí .....	5
2.3	Biologie a ekologie amoebozoí.....	7
2.4	Metody popisu a zařazení amoebozoí.....	8
3	CHARAKTERISTIKA TUBULINEÍ.....	10
3.1	Taxonomie skupiny Euamoebida.....	11
4	ČELEĎ AMOEBIDAE .....	12
4.1	Charakteristika čeledi .....	12
4.2	Charakteristika rodů.....	12
4.3	Rozlišení jednotlivých rodů .....	17
4.3.1	Forma pohybu.....	17
4.3.2	Krystaly .....	17
4.3.3	Povrchová struktura.....	18
4.3.4	Jaderná struktura.....	18
5	ČELEĎ HARTMANNELLIDAE .....	19
5.1	Historický vznik čeledi .....	19
5.2	Charakteristika čeledi .....	19
5.3	Charakteristika rodů.....	20
5.3.1	Rozpad rodu <i>Hartmannella</i> .....	28
6	METODIKA - VLASTNÍ FYLOGENETICKÉ ANALÝZY .....	32
6.1	Zpracování sekvenčních dat.....	32
6.2	Výsledky a diskuze .....	34
7	ZÁVĚR.....	38
8	ZDROJE.....	39

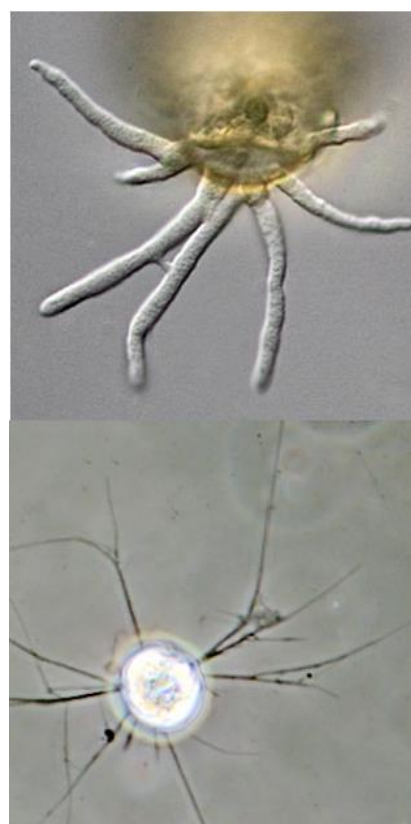
# **1 CÍLE PRÁCE**

Cílem této práce je zpracovat rešerši zaměřenou na améby skupiny Euamoebida (Amoebozoa, Tubulinea) a pokusit se objasnit jejich taxonomii a vývoj názorů na jejich fylogenezi; mimo jiné se také zaměřit na změny při pojmenovávání jednotlivých taxonů. Dílčím cílem je též provedení fylogenetické analýzy sekvencí SSU rDNA odvozených z kmenů améb, které jsou součástí sbírky Laboratoře rybí protistologie ParU AV ČR.

## 2 ÚVOD

### 2.1 Základní charakteristika amoebozoí

Amoebozoa jsou prvoci, kteří se pohybují a krmí za pomoci cytoplazmatického proudění, souvisejícího s tvorbou panožek (pseudopodií), což jsou dočasné výběžky cytoplazmy. Pohyb pseudopodia je zajištěn mikrofilamenty v blízkosti buněčné membrány. Asi polovina vnitřního prostoru buněk amoebozoí obsahuje mikrovlákna. Způsob pohybu amoebozoí se nazývá améboidní pohyb. Je způsobován v podstatě polymerizací a depolymerizací aktinu. Pseudopodium obsahuje jak granuloplazmu, tak i hyaloplazmu. Pokud se améba nepohybuje pouze přímým směrem, její tělo se během pohybu stále mění (polymorfismus). Proto je složité nacházet a definovat morfologické znaky, pomocí kterých by šlo spolehlivě určit, do kterého taxonu patří (Smirnov *et al.*, 2011). Panožky u amébozoí jsou vždy lobopodiového či filopodiového typu (Obr. 1), nikdy však nejde o axopodie ani typické retikulopodie. Forma a struktura pseudopodií je důležitým taxonomickým znakem – u amoebozoí nacházíme zejména neeruptivní lobopodie. Améby ze skupiny Amoebozoa často nemají žádné jiné speciální diferencované pohybové aparáty jako bičíky. Cilie neboli bičíky, pokud jsou přítomny, jsou až na výjimky (jako např. *Phalansterium*) pouze na určitých vývojových stádiích. Amoebozoa jsou charakterizovány nepravidelným tvarem těla. Název „améba“ je odvozen z řeckého slova, které znamená „změnu“. Amoebozoa zahrnují rozsáhlé a velmi různorodé skupiny s více než 2400 popsanych druhů (Pawlowski *et al.*, 2012). Většina z nich jsou volně žijící organismy, které lze nalézt v téměř každém vlhkém nebo vodním habitatu, aerobním nebo anaerobním. Někteří zástupci jsou endosymbionti, včetně patogenních forem a parazitů. Nemoci způsobované amébami skupiny Amoebozoa mohou být i pro člověka velmi nebezpečné: způsobují akantamébovou keratitidu (rod *Acanthamoeba*),

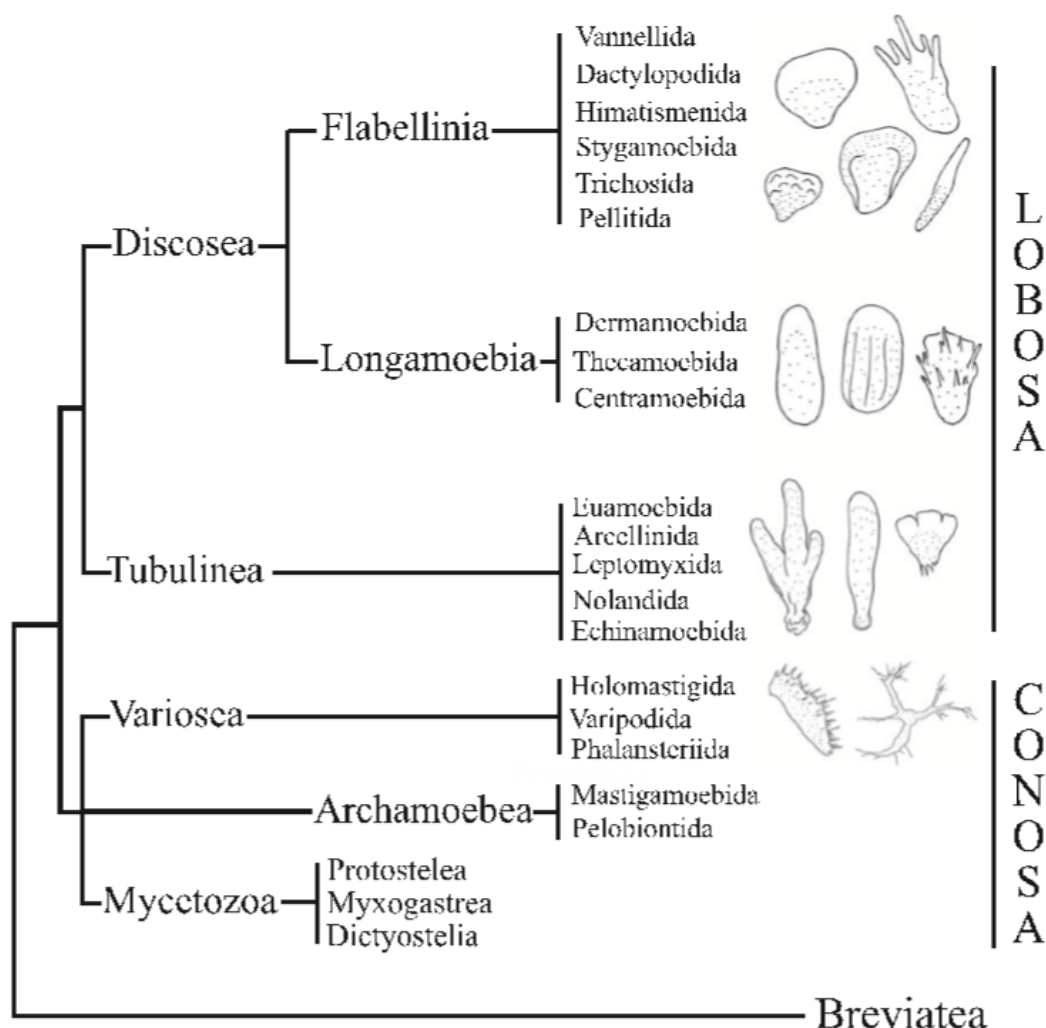


Obrázek 1: Lobopodium a filopodium (URL 1).

granulomatozní amébovou encefalitidu (rody *Acanthamoeba* a *Balamuthia*) nebo měňavkovou úplavici (*Entamoeba histolytica*) (Hausman & Hülsman, 2003).

Zástupci skupiny Amoebozoa, v současném pojetí, byli vyčleněni od ostatních měňavkovitých eukaryot teprve na konci 20. století. Nejprve byly všechny amoéboidní organismy považovány za členy velké taxonomické skupiny Rhizopoda (Smirnov, 2009), což se později ukázalo být jako chybné zařazení.

V současné době se skupina Amoebozoa dělí na dva podkmeny: Lobosa a Conosa (Obr. 2). Améby podkmene Lobosa mohou a nemusejí mít schránku (Cavalier-Smith, 2004), ale nikdy nemají žádný bičík. Do skupiny Conosa jsou řazeny améboidní linie, u kterých se mohou ancestrálně vyskytovat bičíky a také konická mikrotubulární kostra (Smirnov et al., 2011).



Obrázek 2: Jedna z hypotéz o fylogenezi skupiny Amoebozoa (Smirnov et al., 2011).

## Slovníček pojmů

Granuloplazma = typ cytoplazmy nacházející se v okolí buněčného jádra a mající zrnitý charakter

Hyaloplazma = čirá tekutá homogenní základní hmota buněčné plazmy

Panožka = výběžek cytoplazmy sloužící k améboidnímu pohybu

Lobopodie = laločnaté panožky

Filopodie = nitkovité panožky

Axopodie = panožky vyztužené osou z mikrotubulů

Retikulopodie = síťovitě rozvětvené panožky

Trofozoit = vegetativní forma prvoků

Cysta = odolné stádium schopné dlouhodobě přežít za nepříznivých podmínek

Limax forma (monotaktická) = améba, které je vybavená jedinou panožkou



## 2.2 Buněčná morfologie amoebozoí

Základní obal améboidní buňky tvoří cytoplazmatická membrána, skládající se z dvojvrstvy fosfolipidů. Cytoplazmatická membrána se objevuje u všech buněk eukaryotních organismů. Jejím hlavním úkolem je korigovat výměnu jednotlivých látek mezi vnitřním a vnějším prostředím (Letková *et al.*, 2010). Dále se na povrchu buňky nachází glykokalyx, což je polysacharidový mukoidní povlak, který kryje cytoplazmatickou membránu (Hausman & Hülsman, 2003).

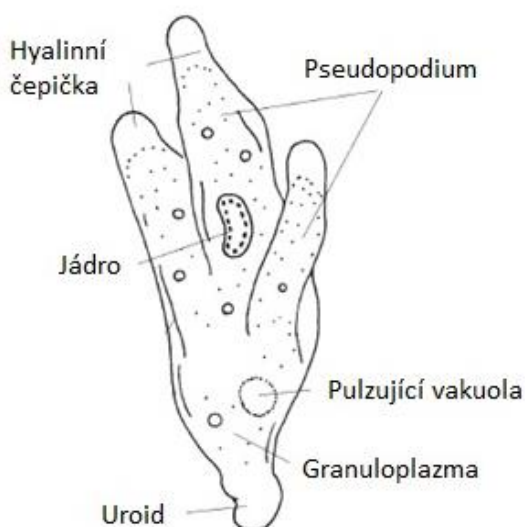
Tak jako u ostatních eukaryot, nejvýznamnější organelou je u améby jádro. Jeho hlavní funkcí je řídit buněčné aktivity, jako je reprodukce, metabolismus a růst. Tato funkce je umožněna specifickými enzymy, které buňka produkuje (Page, 1983). Každá améboidní buňka obsahuje alespoň jedno jádro. Větší buňky jsou často mnohjaderné. Tvar jádra je obvykle kulovitý s centrálním jádérkem. Nicméně, ve většině větších jader může být jádérko roztržité, laločnaté nebo zrnité (Obr.4). Tento tvar je charakteristický pro celou řadu druhů (Smirnov, 2009).

Další membránová organela, která je dobře zřetelná, pokud je přítomna, se nazývá pulzující vakuola. Slouží jako ochranný mechanismus, který brání buňce absorbovat příliš mnoho vody a případnému prasknutí. Stažitelná, neboli pulzující vakuola vylučuje přebytečnou vodu pravidelně z cytoplazmy. Jeden cyklus trvá několik sekund, v závislosti na druhu. Takový mechanismus se nenachází u mořských druhů a většina améb má pouze jeden tento mechanismus (Page, 1988).

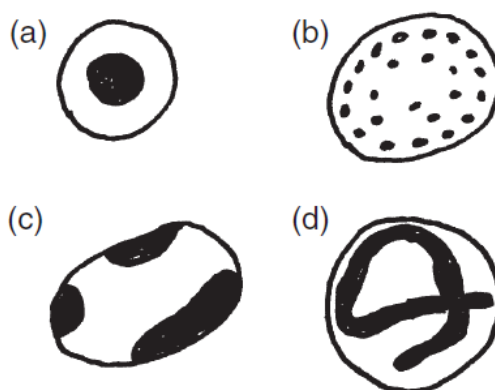
Hlavní hmota cytoplazmy, nazývaná granuloplazma, obsahuje viditelná granula, krystaly a další inkluze. Ribozomy jsou úzce spojeny s endoplazmatickým retikulem nebo volně akumulované v cytoplazmě (Dyková *et al.*, 2008a). Mitochondrie je tvořena vnitřní matrix a kristami. U aerobních améb skupiny Amoebozoa nalezneme tubulární kristy (Hausman & Hülsman, 2003). Během pohybu buňky je na předním okraji patrná oblast transparentního hyaloplazmatu, který vypadá jako čirá voda. Tato přední hyaloplazmatická část tvoří hyalinní pŕlměsíce a je obvykle nazývána hyalinní čepička. Zatímco hyalinní čepička je přední část pohyblivé améby, zadní část se nazývá uroid. U mnoha druhů améb má uroid zřetelný charakteristický tvar. Uroidy mohou být třásnité, vláknité nebo zaoblené (Obr. 5) (Smirnov, 2009).

Cizí látky obsažené v cytoplazmě se nazývají cytoplazmatické inkluze. Jedná se často o živiny, jako jsou proteiny, sacharidy a lipidy. Nejviditelnější inkluze jsou ale krystaly, lipidové kapénky a endosymbionti.

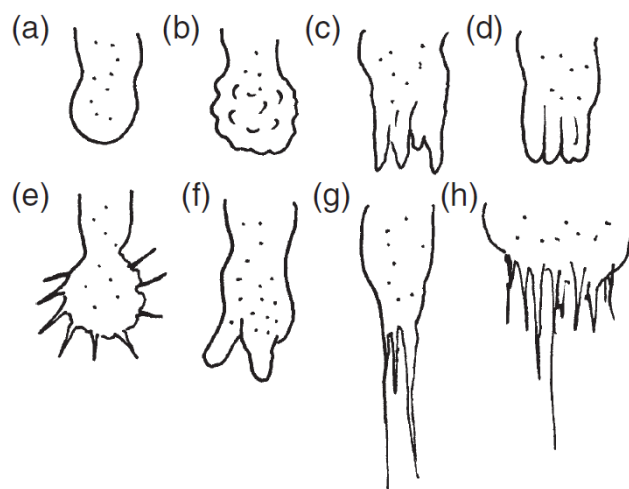
Některé améby skupiny Amoebozoa (např. řád Arcellinida) mohou vytvářet schránky, a to z bílkovinného, vápenitého, nebo křemičitého materiálu. Některé z nich tvoří schránky slepením organických nebo minerálních látek (zrnka písku, schránky rozsivek), které získávají ze svého okolí. Jsou-li stavební jednotky nashromážděné z okolí, nazývají se xenosomy. Některé améby si vytvářejí stavební jednotky samy, vlastní sekrecí. Tyto endogenní stavební jednotky se nazývají idiosomy a jsou nejčastěji křemičité nebo vápenité. Schránky měří od 10  $\mu\text{m}$  do 800  $\mu\text{m}$  a jsou morfologicky velmi rozmanité, což umožňuje identifikaci druhu (Lahr *et. al.*, 2013).



Obrázek 3: Morfologie améby (Smirnov, 2009).



Obrázek 4: Základní typy jader: A vezikulární jádro s centrálním jadérkem, B zrnité jádro, C jádro s obvodovým uspořádáním materiálu jadérka, D jádro s komplexní strukturou (Smirnov, 2009).



Obrázek 5: Hlavní typy uroidů: A cibulkovité, B morulovité, C svazčité, D zřasené, E baňaté s výběžky, F hyalinní laloky, G, H adhesivní (Smirnov, 2009).

### 2.3 Biologie a ekologie amoebozoí

Životní cyklus typických amoébozoí může zahrnovat trofozoity a cysty. Cysty mají buď jednu, nebo dvě stěny, ve druhém případě často s póry v místě kontaktu obou stěn. Malé rozměry a nízká hmotnost améb a vysoká odolnost cyst by měla usnadnit amébám jejich rozptýlení vzduchem a vodními proudy. Toto naznačuje, že jakékoli vhodné stanoviště by mělo obsahovat široké spektrum améb. Všechny améby jsou vodní organismy. Améby nacházející se v půdě obývají vrstvu kapilární vody obklopující půdní částice (Smirnov, 2009).

Amoebozoa přijímají potravu pomocí fagocytózy a pinocytózy přes membránu (Letková *et al.*, 2010). Primárním zdrojem potravy jsou pro améby bakterie. Většina amoéboidních druhů je polyfágních a v kultuře mohou požídat buď bakterie, nebo jiné prvky vhodné velikosti. Některé amoéboidní druhy žijící v půdě se jeví být potravně zaměřené na houby (Smirnov, 2009).

Žádnému z dosud známých druhů volně žijících lobózních améb skupiny Amoebozoa nechybí funkční mitochondrie. Znamená to, že jsou aerobní. Nicméně některé druhy (např. *Vannella peregrinia*) mohou přežívat i při velmi nízké nebo prakticky nulové koncentraci kyslíku (Smirnov, 2009).

## 2.4 Metody popisu a zařazení amoebozoí

Z počátku bylo velmi obtížné rozlišit jednotlivé druhy améb a zařadit je do taxonomického systému, jelikož améby jsou polymorfní, což znamená, že jedna buňka může přijmout velmi různé tvary, a to zejména pokud je v klidu nebo pokud se pohybuje nekoordinovaným způsobem, často při změně směru pohybu. Většina améboidních buněk nemá trvale diferencované organely, jako jsou bičíky, které by mohly být snadno popsány a nevyznačují se ani dalšími stabilními morfologickými znaky. Někteří starší autoři uvedli, že améba prostě nemá “žádný tvar“ (Page, 1967).

V dobách, kdy neexistovala elektronová mikroskopie ani sekvenace genů, se museli vědci spoléhat hlavně na zařazení podle morfologických znaků viděných v optickém mikroskopu. Na rozdíl od mnoha jiných prvků jsou nahé améby při konzervování ve fixačních přípravcích obvykle deformovány a ztrácí mnoho důležitých znaků živého organismu, což také znemožňovalo jejich klasifikaci. Malý počet morfologických znaků užitečných pro taxonomii měl za následek špatné rozlišení druhů. Bylo obtížné rozhodnout, které znaky jsou specifické pro daný druh a které jsou užitečné pro vytváření taxonů. V polovině 19. století se přišlo na to, že při pohybu améby má její zadní část zvláštní, nevšední tvar, nazývaný uroid, užitečný pro taxonomii. Následně bylo poukázáno na význam vzhledu a struktury jádra (Page, 1967). Na počátku 20. století někteří autoři uvedli, že aktivně se pohybující améba má i přes drobné výkyvy více či méně dynamicky stabilní tvary (specifické hlavní rysy a znaky, jako je pozice hyaloplazmy, hřbetní nebo boční hřebeny, plochost), které mohou být rodově nebo dokonce druhově specifické a že nejspolehlivějším kritériem pro klasifikaci améb je dělení jádra (Page, 1967). T. Jahn a E. Bovee vytvořili systém založený na vzoru cytoplazmatického toku (Jahn & Bovee 1965).

Souběžně s pokusy pro lepší klasifikaci améb na vyšší taxonomické úrovni, byla velká pozornost zaměřena na zlepšování mikrosystematiky, tedy uznání hranice améboidních druhů. Vývoj elektronové mikroskopie vedl k objevení rozdílů v buněčném povrchu, ve struktuře jaderné laminy, a dalších vlastnostech, které pomohly vědcům vymezit rody améb (Page 1985, 1986). Většina z těchto ultrastrukturálně vymezených rodů je nyní potvrzena molekulárními studiemi. Nicméně, elektronová mikroskopie nebyla pro rozlišení druhu dostačující, protože ultrastruktura améb je ve stejném rodu poměrně uniformní. Elektronová mikroskopie také nedokázala odhalit žádné sdílené znaky, který by mohly pomoci objasnit složení čeledí a vyšších taxonů, tedy kromě tvaru mitochondriálních krist. Tento poslední

znak podpořil oddělení lobózních améb s plynulým cytoplazmatickým prouděním od těch s eruptivním prouděním cytoplazmy. Molekulární studie ukazují, že všechny nahé lobózní améby bez eruptivního proudění cytoplazmy patří do skupiny Amoebozoa (Cavalier-Smith 1998), ale tvoří její monofyletickou podskupinu. I s rozvojem elektronové mikroskopie se ale ukázaly morfologické údaje jako nedostatečné pro stanovení vyšších taxonů améb a jejich vztahů s ostatními prvky.

Pokusy o vytvoření systémů améb, využívající stále více a více nových znaků, nikdy nepřestaly. Bovee (1985) publikoval poslední systém založený výhradně na morfologii pozorovatelné pomocí světelné mikroskopie. Poté Page (1987) navrhl systém, který využívá mnoho elektron-mikroskopických znaků a po zveřejnění tohoto systému bylo od všech ostatních systémů améb prakticky upuštěno.

Zanedlouho byl ale tímtož autorem poupraven nový systém amoeboidních organismů, kombinující světelnou a elektronovou mikroskopii společně s některými aspekty jejich biologie a fyziologie (Page 1988).

Nejvíce změn ale nastalo s rozvojem sekvenování genů. U amoeboidních organismů se sekvenuje zejména gen pro 18S rRNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA). Tento gen je jeden z nejčastěji používaných genů pro fylogenetické studie zabývající se příbuzností jednotlivých forem života. Je snadno přístupný, neboť obsahuje dobře známé a konzervované okrajové segmenty, a tak není problém s hledáním vhodných primerů. Navíc se gen pro rRNA vyskytuje v genomu mnohokrát a tím pádem je i u nejmenších organismů vždy dostatek materiálu pro zahájení polymerázové řetězové reakce. Tato moderní metoda vede k objevování nových druhů i rodů, ale také k přejmenovávání stávajících druhů, u kterých se ukázalo, že jejich původní zařazení neodpovídá novým poznatkům. Závažné chyby ve vytváření fylogenetických stromů mohou být způsobeny špatnou identifikací améby nebo špatným popisem améb, podle nichž jsou další améby přiřazovány k určitému rodu (Dyková, 2008).

Vzhledem k velké rozmanitosti améb je k dispozici pouze velmi malé množství dobře popsaných a molekulárně charakterizovaných kmenů.

### 3 CHARAKTERISTIKA TUBULINEÍ

Skupina Tubulinea je monofyletická linie v rámci Amoebozoa (Smirnov, 2005). Vnitřní uspořádání této skupiny prodělalo během posledního desetiletí poměrně velké změny. V současné době je rozdělena do pěti hlavních skupin (Echinamoeboida, Leptomyxida, Euamoebida, Poseidonida a Arcellinida), které jsou molekulárně dobře odlišeny (Lahr *et al.* 2011).

Morfologicky se vyznačují cylindrickým pseudopodiem (tvořeným alespoň za určitých podmínek) a monoaxiálním prouděním cytoplazmy (Smirnov, 2005). Některé organismy v této skupině mohou vytvářet několik cylindrických pseudopodií, jako například rod *Amoeba*, zatímco jiní mají jediné subcylindrické pseudopodium, vytvářející tzv. „limax“ formu, jako je tomu u rodu *Saccamoeba* (Lahr *et al.*, 2013).

Provádějí se fylogenetické analýzy využívající šesti genů (SSU rDNA, actin,  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulin, elongační faktor 2 a 14-3-3 regulační protein) ke zhodnocení evolučních vztahů uvnitř Tubulinea. Současná rekonstrukce fylogeneze se však z velké části spoléhá na SSU rDNA a v menší míře na geny pro aktin, které mají odhalit vztahy mezi těmito organismy. Lahr *et al.* (2013) potvrzuje monofylii u 4 z 5 výše zmíněných hlavních skupin. Skupina Arcellinida není monofyletická.

Některé rody v rámci třídy Tubulinea byly taxonomicky nestabilní. Pravděpodobně nejvíce postižen nedávnými molekulárními rekonstrukcemi je rod *Hartmannella* (Lahr *et al.*, 2013).

### 3.1 Taxonomie skupiny Euamoebida

Níže (Obr. 6) je uvedena současná taxonomie skupiny Euamoebida sestavená podle Cavalier-Smith (2013). Vyobrazený fylogenetický systém je zkrácený a zaměřený pouze na třídu Tubulinea, jelikož se v této studii budu zabývat především amébami řádu Euamoebida.

Kmen AMOEBOZOA  
Podkmen LOBOSA

**Třída Tubulinea (=Lobosea)**  
**Řád Euamoebida**  
Čeleď Amoebidae – rody *Amoeba*, *Chaos*, *Polychaos*, *Parachaos*,  
*Trichamoeba*, *Deuteramoeba*, *Hydramoeba*  
Čeleď Hartmannellidae – rody *Cashia*, *Copromyxa*, *Copromyxella*, *Glaeseria*,  
*Hartmannella*, *Saccamoeba*, *Ptolemeba*

Řád Arcellinida  
Řád Leptomyxida  
Čeleď Leptomyxidae  
Čeleď Flabellulidae  
Čeleď Gephyramoebidae  
Řád Nolandida (=Poseidonida)  
Čeleď Nolandellidae  
Řád Echinamoebida  
Čeleď Echinamoebidae  
Čeleď Vermamoebidae

Obrázek 6: Zkrácený fylogenetický systém amoebozoí se zaměřením na améby řádu Euamobida (Cavalier- Smith, 2013).

## 4 ČELEĎ AMOEBIDAE

### 4.1 Charakteristika čeledi

Předpokládá se, že čeleď Amoebidae je monofyletická (bootstrapová hodnota pro monofylum zahrnující zástupce rodů *Amoeba* a *Chaos* je 100 %) (Lahr *et al.*, 2013) a její taxonomie ani složení se v posledních desetiletích v zásadě neměnily. Améby čeledi Amoebidae se vyznačují pohybovou formou s jedním nebo většinou s více subcylindrickými, granuloplazmatickými pseudopodii s hyalinními čepičkami. Plovoucí forma má pseudopodia vyčnívající v několika směrech a většinou jsou tenčí a početnější než u pohybové formy. Améby v této čeledi jsou jedno- nebo více- jaderné. Ve většině případů se materiál jádérka nachází v mnoha malých oblastech. Uvnitř buňky se nachází mnoho cytoplazmatických krystalů, které mají většinou tvar bipyramidy. Glykokalyx se vyvinul do široké vrstvy vláken, často čnicích kolmo z plazmatické membrány. Uvnitř jádra mnoha druhů je zřetelná voštinovitá lamina, která ale není přítomna u všech druhů. Do čeledi Amoebidae jsou řazeny rody *Amoeba*, *Chaos*, *Polychaos*, *Parachaos*, *Trichamoeba*, *Deuteroamoeba* a *Hydramoeba* (Page, 1988; Smirnov, 2009).

### 4.2 Charakteristika rodů

#### Rod *Amoeba* Bory de Saint – Vincent, 1822

Sladkovodní jednojaderné améby, většinou polyodiální s jedním dominantním pseudopodiem. Monopodiální jsou v rychlém pohybu. Cytoplazmatické krystaly mají zřetelný tvar bipyramid nebo tenkých obdélníkových destiček. Buněčný povrch je pokrytý zkroucenými vlákny. Vnitřní jaderná lamina je voštinovitá. Typový a nejznámější druh je *Amoeba proteus* Leidy, 1878 (Page, 1986; Page, 1988).





Obrázek 7: *Amoeba proteus* (URL 2).

### **Rod *Chaos* Linnaeus, 1767**

Sladkovodní améby, objevující se v rybnících a řekách, zejména brzy na jaře. Nejsou vzácné. Buňky jsou mnohjaderné, některé mohou mít více než 1000 jader. Většinou jsou polyradiální, v rychlém pohybu však mohou být monopodiální. Zástupci tohoto rodu jsou poměrně velcí. Jejich délka se pohybuje v rozmezí 600 až 1500  $\mu\text{m}$ , někdy ale mohou dosahovat délky až 5000  $\mu\text{m}$ . Většina cytoplazmatických krystalů má zřetelný tvar bipyramid. Buněčný povrch je pokryt zkroucenými vlákny. Vnitřní jaderná lamina je voštinovitá. Typový a nejznámější druh je *Chaos chaos* Linnaeus, 1758 (Page 1986; Page 1988).

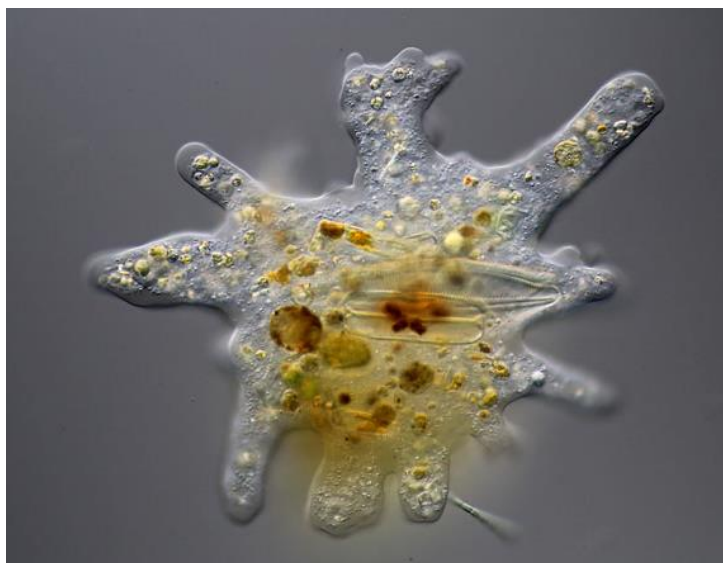
Dalším druhem patřícím do tohoto rodu je například *Chaos illinoisense*, velká sladkovodní mnohjaderná améba, která byla nejdříve zaznamenána pouze v malém rybníku v Illinois, Severní Amerika, byla nově objevena v ramenu řeky Luga, Rusko. Améby byly kultivovány, klonovány, a studovány za použití světelné a elektronové mikroskopie. Tento druh je v současné době jediný známý zástupce rodu, který tvoří cysty. V buňce se nachází velké množství cytoplazmatických krystalů, majících buď deskovitý tvar a nebo formu bipyramidy. Trofozoiti obsahují několik set sférických zrnitých jader. Vlákničitá vnitřní jaderná lamina má voštinovitou strukturu. Také byl u tohoto druhu odhalen výrazný mitochondriální heteromorfismus a u buňky byl prokázán dvouvrstevný povrchový plášť vláknitého vzhledu (Gootkov, 1999).



Obrázek 8: *Chaos chaos* (URL 3).

### **Rod *Polychaos* Schaeffer, 1926**

Jednojaderné améby, které jsou při aktivním pohybu obvykle polypodiální. V rychlém pohybu jsou monopodiální a mají baňatý (cibulkovitý) uroid. Pseudopodia bývají nejčastěji trubkovitá, někdy mohou mít ale také zploštělý tvar s rozšířeným koncem. Cytoplazmatické krystaly jsou často zřetelně bipiramidální. Buněčný povrch je tvořen mnoha jemnými, víceméně rovnými vlákny, které vybíhají z plazmatické membrány. Vnitřní jaderná lamina má voštinovitou strukturu. Typový a nejznámější druh je *Polychaos dubium* Schaeffer, 1916 (Page, 1986; Page 1988).



Obrázek 9: *Polychaos dubium* (URL 4).

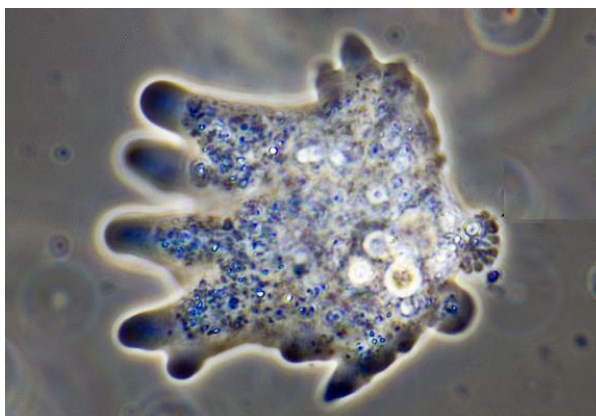
### Rod *Deuteramoeba* Page, 1986

Sladkovodní a půdní améby. Buňky mají jedno kulovité jádro. Jadérko je rozděleno do několika nezávislých částí. Forma buněk je většinou polypodiální, i když jeden druh je monopodiální a polypodiální je pouze příležitostně. Pohybující se buňka má délku 70 – 180  $\mu\text{m}$  a má jedno dominantní pseudopodium. Pseudopodia jsou bez zvrásnění. Cytoplazmatické krystaly nacházíme pouze zřídka. Pokud jsou přítomny, mají tvar destiček nebo bipyramid. Tvar tělísek připomíná přesýpací hodiny. Vlákňitý povrch je bez zřetelných, oddělených vláken vyběhajících z plazmatické membrány. Vnitřní jaderná lamina se jeví jako vrstva vláken paralelní k jaderné membráně. Přední hyalinní čepička je často naplněná postupující granuloplazmou. Zadní uroid má moruškovitý tvar. Jsou známy dva pojmenované druhy, jednak *Deuteramoeba mycophaga* Pussard, Alabouvette, Lemaitre a Pons, 1980, který je neobvyklý tím, že se živí houbami, jednak *Deuteramoeba algonquinensis* Baldock, Rogerson a Berger, 1983 (Page, 1986; Page, 1988).

Oba druhy zůstaly dlouho nepovšimnuté, až do nedávné doby, kdy byly nalezeny Mrvou (2010) v půdních habitatech v Malých Karpatech (Slovensko). Byla zkoumána morfologie obou druhů za pomoci světelné mikroskopie a Pageův (1986, 1988) popis druhů byl mírně poupraven.

Polypodiální a monopodiální pohybová forma *D. algonquinensis* je typická velkou hyalinní čepičkou na předních koncích pseudopodia. Dalším znakem je kulovité jádro s mnoha jadérky a párové inkluze v cytoplazmě.

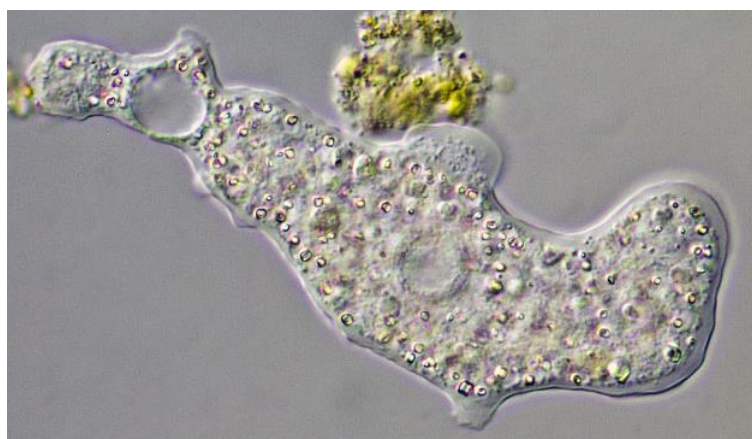
*D. mycophaga* má širokou monopodiální pohybovou formu s mělkou hyalinní čepičkou na předním konci. Jádro je vezikulární a v cytoplazmě se nachází mnoho prodloužených bipyramidálních krystalů, cytoplazma se tak jeví mnohem hustší než u *D. algonquinensis* (Mrva, 2010).



Obrázek 10: *Deuteramoeba algonquinensis* (URL 5).

### Rod *Trichamoeba* Fromentel, 1874

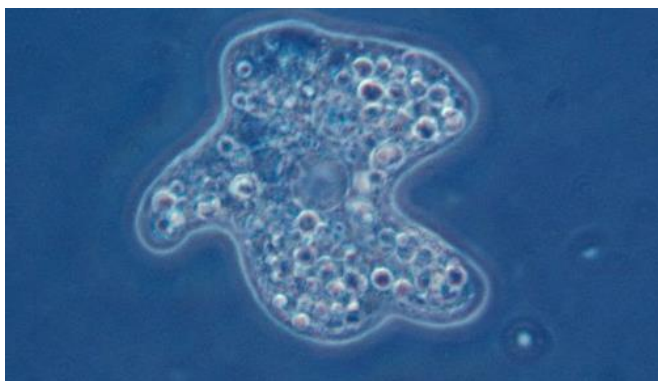
Sladkovodní i mořské jednojaderné améby. Jádro je obvykle zrnité s několika jadérky. Aktivní pohybová forma je forma limax s vyčnívajícími pseudopodii. Buňky jsou pravidelně monopodiální v pohybu a dosahují délky 75 až 250  $\mu\text{m}$ . Všechny nebo většina cytoplazmatických krystalů jsou bipyramidální. Povrchový plášť má nejasný vzhled a jádro nemá rozpoznatelnou vnitřní laminu. Uroid je baňatý, nebo s krátkými klky, některé uroidy mají jemná vlákna. Tento rod je volně žijící. Typový a nejznámější druh je *Trichamoeba hirta* Fromentel, 1874 (Page, 1986; Page 1988).



Obrázek 11: *Trichamoeba sinuosa* (URL 6).

### Rod *Hydramoeba* Reynolds a Looper, 1928

Obvykle jednojaderné, ale mohou mít až 3 jádra, zpravidla monopodiální améby, které nejčastěji dosahují délky 150 až 250  $\mu\text{m}$ . Jádro je kulovité, s průměrem 15  $\mu\text{m}$ , má centrální jadérko a hrubé jaderné fragmenty. Všechny nebo většina cytoplazmatických krystalů jsou bipyramidální. Povrch améby má sametový vzhled. V jádru není rozpoznatelná vnitřní lamina. Rod *Hydramoeba* je parazit sladkovodních žahavců (Cnidaria). Tyto améby nevytváří žádné cysty. Typový a jediný druh je *Hydramoeba hydroxena* Entz, 1912 (Page, 1986; Page, 1988).



Obrázek 12: *Hydramoeba hydroxena* (URL 7).

### 4.3 Rozlišení jednotlivých rodů

#### 4.3.1 Forma pohybu

Na počátku 20. století Schaeffer uvedl, že aktivně se pohybující améby mají i přes malé změny více či méně dynamicky stabilní tvar se specifickými hlavními rysy a znaky, jako je poloha hyaloplazmatu a hřbetní nebo boční vrásky, které mohou být rodově nebo dokonce druhově specifické. Zavedl pojem „pohybová forma“ a prohlásil tento znak za nejlepší způsob popisu améb (Siemensma & Page, 1986).

Pohybová forma byla v minulosti nejvíce používaným, a zpočátku prakticky jediným, určujícím znakem k rozeznání rodů. Zkoumalo se např., zda je améba polypodiální nebo monopodiální (Siemensma & Page, 1986). Dalším určujícím znakem pohybových forem byly uroidy, jejichž tvary jsem zmínila již v úvodu.

#### 4.3.2 Krystaly

Za pomoci světelné mikroskopie byl objeven znak, který se ukázal být taxonomicky velice zajímavý. Jednalo se o hojný výskyt cytoplazmatických krystalů. Navzdory tomu, že byly améby nejdříve popsány bez krystalů, se ukázalo, že všechny dobře prostudované laboratorní kmeny Amoebida obsahují krystaly. Nějkčastěji se tyto krystaly vyskytují v bipyramidální formě, která je zřetelná nejen u druhu *A. proteus*, ale také u dalších, jako je

například *A. leningradensis* Page a Kalinina, 1984, *P. fasciculatum* Page a Baldock, 1980, *C. carolinense*, *C. nobile*, *T. sinuosa* a *H. hydroxena* Page a Robson, 1983 (Page, 1988).

Obzvláště pozoruhodný je výskyt párových inkluzí u *D. algonquinensis* a *P. dubium* který slouží jako jeden z ukazatelů, pro odlišení těchto druhů od ostatních.

#### 4.3.3 Povrchová struktura

Pro čed' Amoebidae je charakteristický povrch z vláken glykokalyxu, která jsou většinou jednotlivě rozpoznatelná elektronovým mikroskopem.

Povrchová vrstva *A. algonquinensis* se zdá být vláknitá, ale jednotlivá vlákna nebyla rozpoznatelná, jako tomu je u všech ostatních kmenech améb, kromě *A. leningradensis*. Nedostatek tohoto pokrytí na *A. leningradensis* může být zapříčiněn redukcí glykokalyx. Vláknité vrstvy dvou kmenů *Chaos* byly podobné k *A. proteus*, ale vlákna byla tenčí a jejich tloušťka se ještě měnila z důvodu překrývání a ohýbání. Také vlákna na *C. nobile* byla více zkroucená a spíše připomínala vlákna *A. proteus*. Celková tloušťka povrchové vrstvy byla 176 – 240 nm (Page, 1988).

Původní tvrzení, že povrchová vrstva *Polychaos dubium* není vláknitá, bylo vyvráceno studií Page (1988), která ukázala, že je povrch pokryt velmi jemnými víceméně rovnými vlákny, směřujícími od buněčného povrchu kolmo kolem obrysu améby. Rozeznatelná délka těchto vláken byla 170 – 180 nm nad plazmatickou membránou (Page, 1988).

#### 4.3.4 Jaderná struktura

Typické jádro Amoebidae je zrnité nebo oválné s mnoha jádérky. Jadérko může být laločnaté, jako je tomu u *P. fasciculatum*. U jednotlivých améb se zkoumala struktura různě velikých jader a ukázalo se, že améby s největšími jádry mají jádra vybavena voštinovitou vnitřní laminou. Tímto zjištěním vznikla myšlenka, že hlavní funkcí laminy je podpora větších jader při zachování jejich tvaru (Page & Robson, 1983). Na druhou stranu, nejmenší jádro *D. algonquinensis* mělo také zřetelnou, silnou laminu, ale větší jádra *T. sinuosa* a *H. hydroxena* laminu neměla (Page, 1988).

## 5 ČELEĎ HARTMANNELLIDAE

### 5.1 Historický vznik čeledi

V roce 1912 popsal Alexeieff dva rody, *Naegleria* a *Hartmannella*, které patřily do třídy Rhizopodea Siebold, 1845, podtřídy Lobosia Carpenter, 1861 a řádu Amoebida Kent, 1880. Tímto rozdělil drobné améby do dvou skupin, založených na přítomnosti nebo absenci polární hmoty během jaderného dělení. Jeho taxonomie byla ale ve skutečnosti spíše klasifikací mitotických struktur než celých améb. (Page, 1974).

Rod *Hartmannella*, tak jak byl definován Alexeieffem, zahrnoval heterogenní skupinu améb. Podle jeho diagnózy, by měly všechny různorodé améby, bez ohledu na jejich tvar, které nemají promitotické jaderné dělení, patřit do rodu *Hartmannella*. S dalšími studii mitózy u améb se heterogenita rodu *Hartmannella* stala tak zřejmá, že byl rod formálně rozdělen do několika skupin (Page, 1974). Byla vytvořena čeleď Hartmannellidae, do které patřily tři rody: *Hartmannella*, *Acanthamoeba* a *Glaeseria* (Page, 1967). Později byl rod *Acanthamoeba* vyčleněn v samostatné čeledi.

### 5.2 Charakteristika čeledi

Hartmannellidae v současném pojetí jsou skupinou malých (30 – 40  $\mu\text{m}$ ) jednojaderných améb, které se nejčastěji nacházejí v půdě a ve vodě. Hartmannellidní améby jsou od sebe morfologicky těžko rozpoznatelné. Jejich jádro obsahuje centrální jádérko. Tyto améby jsou monopodiální. V aktivním pohybu mají zhruba válcovitý tvar s jedním předním pseudopodiem bez subpseudopodií. Takovéto formy jsou také nazývány limax améby. Většina plovoucích forem této čeledi je bez pseudopodií (Page, 1985).

Monofylie čeledi Hartmannellidae není podpořena. Polyfyletická povaha některých rodů (*Saccamoeba*, *Hartmannella*) (Dyková *et. al.*, 2008) vedla k mnoha taxonomickým problémům. Hartmannellidní améby byly v poslední době přezkoumávány a nově definovány (Brown *et al.*, 2010; Smirnov *et al.*, 2011), což vedlo k eliminaci některých z problémů. Nejnovější studie vyčleňuje některé druhy rodu *Saccamoeba* 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 (Brown *et. al.*, 2010).

V tradičním pojetí skupina zahrnuje zejména rody *Cashia*, *Glaeseria*, *Hartmannella* a *Saccamoeba*. Překvapivě se ukázalo, že do této skupiny patří i rody *Copromyxa* a patrně i *Copromyxella* (Brown *et al.*, 2010). V nedávné době v čeledi Hartmannellidae vznikl rod *Ptolemeba*.

### 5.3 Charakteristika rodů

#### Rod *Cashia* Page, 1974

Jedná se o sladkovodní améby s monopodiální pohybovou formou. Hyalinní čepička není většinou přítomna, pokud se však objevuje, je omezena pouze na tenké půlměsíčné oblasti. Zadní část buňky je hladká nebo s malými uroidy. Jádru má kulovitý tvar s centrálním jádérkem. U tohoto rodu nebyly zaznamenány žádné cytoplazmatické krystaly. Mitochondrie mají šroubovicovitě vinuté krysty. Cysty nejsou u rodu *Cashia* tvořeny (Page, 1974).

#### Druh *Cashia limacoides* Page, 1967

Tato malá améba (7,5 – 25,5  $\mu\text{m}$ ) byla poprvé získána z malého jezera v Alabamě, USA a popsána jako *Hartmannella limacoides* Page (1967). Později byl její výskyt hlášen Červou (1971) v plaveckém bazénu v Ústí nad Labem a následně Červou a Huldtem (1974) v plaveckém bazénu ve Stockholmu. Malá velikost buněk a neznalost stádia cysty u tohoto druhu znesnadnila jeho identifikaci. Byl to také hlavní důvod pro vytvoření nového rodu *Cashia* pro tento druh (Page, 1985).

Mitochondrie jsou v profilu oválné až eliptické. Jejich maximální délka je 1.1  $\mu\text{m}$ . Tubulární krysty, které bývají pouze zřídka rozvětvené a v průměru měří 50 – 60 nm, jsou helikální, což je považováno za charakteristiku celého rodu. Hyalinní čepička bývá hodně redukována, nebo zcela chybí (Page, 1988). Golgiho aparát se skládá nejčastěji ze 4 váčků. U této améby nebyly zaznamenány endocytické bakterie a za pomoci světelné mikroskopie nebyly spatřeny žádné opticky aktivní inkluze. Po dobu skoro 20 let v kultuře tento kmen nikdy nevytvořil cysty (Page, 1985), takže si troufám tvrdit, že druh *Cashia limacoides* cysty nevytváří.





Obrázek 13: *Cashia limacoides* (URL 8).

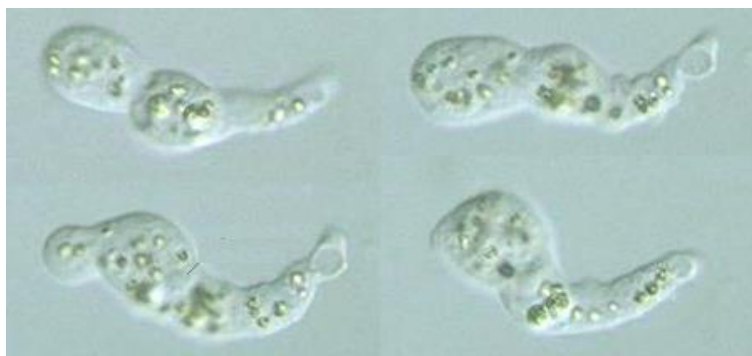
### **Rod *Glaeseria* Volkonsky, 1931**

Rod *Glaeseria* je rod sladkovodních améb, ale nachází se také ve střevech želv. Jako první popsal tento rod Volkonsky (1931). Pohybová forma je tenká a dosahuje délky až 70 mikrometrů. Pseudopodia mají často tenkou hyalinní čepičku. V buňce nejsou přítomny cytoplazmatické krystaly. Na zadním konci améby se nacházejí kontraktilní vakuoly a uroid, ze kterého někdy vybíhají vlákna. Cysty jsou charakteristické hladkou vnitřní stěnou a lepivým vnějším pláštěm a jsou jednojaderné až trojjaderné (Page, 1985).

Od hartmannell se tento rod odlišuje na základě ultrastrukturálních rysů, jsou větší, na povrchu mívají kalíškovité struktury a chybí jim podlouhlé mitochondrie (Page, 1988).

### **Druh *Glaeseria mira* Glaser, 1912**

Druh *Glaeseria mira* vytváří cysty, ve kterých probíhá jaderné dělení. Mitochondrie jsou oválné nebo eliptické a jejich délka se většinou pohybuje v rozmezí 0.9 – 1.2  $\mu\text{m}$ . Kristy jsou ve většině případů tubulární s průměrem okolo 40 nm. Golgiho aparát je nejčastěji tvořen z 5 nebo 6 váčků. U tohoto rodu nebyly pozorovány endocytické bakterie ani žádné opticky aktivní inkluze (Page, 1985).



Obrázek 14: *Glaeseria mira* (URL 9).

### **Rody *Saccamoeba* Frenzel, 1892 a *Ptolemeba* Watson, 2014**

Améby rodu *Saccamoeba* jsou popsány jako sladkovodní a mořské středně velké améby s aktivní pohybovou formou. Existují také plovoucí formy s nepravidelně zaoblenými pseudopodii. Aktivní limax améba má vezikulární jádra, která jsou obklopena jadernou membránou. Zadní část buňky obsahuje kontraktilní vakuolu a uroid s jemnými klky. V buňkách se obvykle vyskytují cytoplazmatické krystaly. V cystách neprobíhá jaderné dělení, pokud jsou cysty vůbec vytvořeny. U dvou druhů (*S. limax*, *S. Stagnicola*) byly přítomny endocytické bakterie (Page, 1988).

Rod *Saccamoeba* je v tradičním pojetí polyfyletický, zástupci tohoto rodu se objevovali ve fylogenetických analýzách současně na dvou větvích. Pro eliminaci těchto problémů byla nutná taxonomická revize.

Ze vzorků půdy byly Watsonem *et al.* (2014) získány 3 různé kmeny sladkovodních/půdních améb. Izoláty vypadaly jako *Saccamoeba* sp. s limax formou a neměly výraznou hyalinní čepičku. Byla zveřejněna jejich morfologická a ultrastrukturální data, stejně tak i SSU rDNA fylogeneze všech izolátů. Ukázalo se, že molekulárně i morfologicky odpovídají tyto kmeny již dříve známým amébám označovaným jako saccamoeby (kmeny ATCC 30942 a LOS7N), které se však ve fylogenetických stromech umísťovaly na samostatnou větev stranou ostatních saccamoeb. Watson *et al.* vytvořili pro tyto améby nový rod, *Ptolemeba*. Zmíněné kmeny ATCC 30942 a LOS7N patří společně s jedním z půdních izolátů do druhu *P. bulliensis*, další dva z půdy izolované kmeny pak do druhu *P. noxubium*. Zástupci druhu *P. bulliensis* vytvářejí sesterskou linii k druhému druhu ptoleméb, ale mají jinak uspořádané mitochondriální krysty: jsou u nich nápadně pravidelně

paralelně uspořádány (autoři popisu přitom chybně uvádějí, že jde o helikálně vinuté krysty – viz také Dyková *et. al.* 2002), kdežto u druhu *P. noxubium* ne – zde jsou uspořádány nepravidelně.

#### Druh *Saccamoeba stagnicola* Page, 1974

Povrchová struktura pláště tohoto druhu se na první pohled jevila složená z mnoha krátkých vláken, ale bližší průzkum ukázal, že se jedná o jemné, šestihranné prvky asi 25 nm vysoké se stejným příčným průměrem (Page, 1985). Mitochondrie jsou nejčastěji protáhlé, byly viděny také oválné a kruhové profily. Tubulární krysty mají kroucený vzhled, ale nemají pravidelnou helikální strukturu. Golgiho aparát je zploštělý nebo mírně bikonkávní, většinou s 5 váčky, se šířkou až 1  $\mu\text{m}$ . Drsné endoplazmatické retikulum má podobu malých, mírně stlačených vezikulů. Nikdy nebyly pozorovány cytoplazmatické krystaly. U tohoto druhu byla přítomna endocytická bakterie. Druh *S. stagnicola* vytváří cysty, jejichž stěny se skládají ze dvou zřetelných vrstev. (Page, 1988).

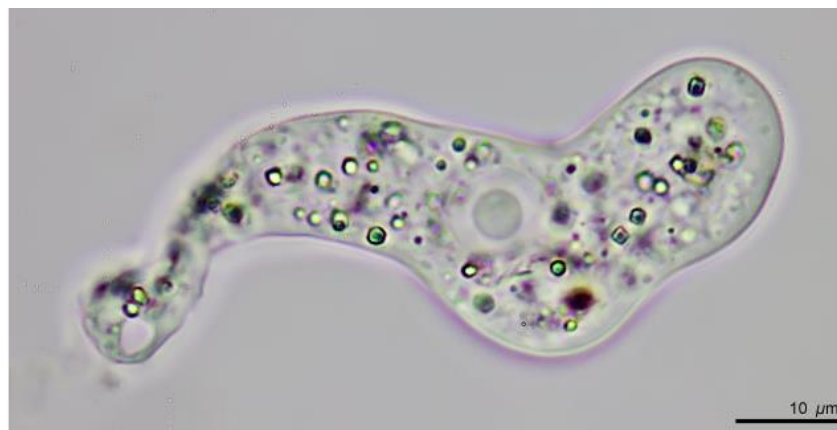


Obrázek 15: *Saccamoeba stagnicola* (URL 10).

#### Druh *Saccamoeba limax* Dujardin, 1841

Tento druh se zdá být poměrně častým a rozšířeným, alespoň na severní polokouli. Byly zkoumány kmeny ze Skotska a z Alabamy, USA. Améby z Ameriky byly menší, s průměrnou délkou 56  $\mu\text{m}$ , oproti tomu Améby ze Skotska měřily v průměru 63,8  $\mu\text{m}$  (Page, 1986). Jádro má v průměru 6 – 11  $\mu\text{m}$  a někdy vykazuje známky vnitřní laminy. Cytoplazmatické krystaly mají tvar bipyramid a po několika letech v kultuře mizí (Page,

1988). Mitochondrie jsou oválné až eliptické v profilu, nikdy však podlouhlé, s maximální délkou 1,2  $\mu\text{m}$ . Kristy jsou tubulární, zřídka větvené, s průměrem většinou 50 nm. Golgiho aparáty se skládají ze 4 nebo 5 váčků. Často se vyskytují v párech. Hrubé endoplazmatické retikulum má formu podlouhlých, zploštělých kanálků a okrouhlých váčků. V buňkách byly nalezeny endocytické bakterie. Tento druh nevytváří cysty (Page, 1985).



Obrázek 16: *Saccamoeba limax* (URL 11).

#### Druh *Saccamoeba lacustris* Corsaro, 2010

Jedná se o nově popsany druh améby, získané z vodního biotopu, která byla nejdříve morfologicky identifikovaná jako *Saccamoeba limax*. Velkým překvapením bylo zjištění, že *S. lacustris* v sobě ukrývala tyčinkovité gram-negativní bakterie. Během pěstování améb na agaru se u některých subpopulací objevila infekce organismy připomínajícími chlamydie. Byla provedena molekulární identifikace jak hostitele (améby), tak dvou bakteriálních endosymbiontů (Corsaro, 2010).

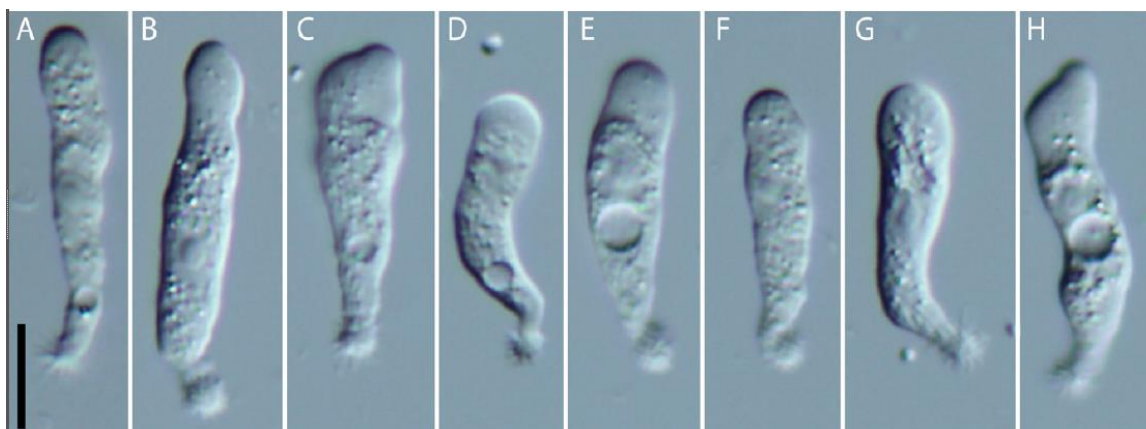
Analýza 18S rRNA genu odhalila, že vyizolovaná améba je zcela nový druh, pro který bylo navrženo jméno *Saccamoeba lacustris*. Tyčinkovitý endosymbiont byl identifikován jako člen skupiny druhů příbuzných *Variovorax paradoxus* (Corsaro, 2010).



Obrázek 17: *Saccamoeba lacustris* (Corsaro, 2010).

Druh *Ptolemeba bulliensis* Brown *et al.*, 2014

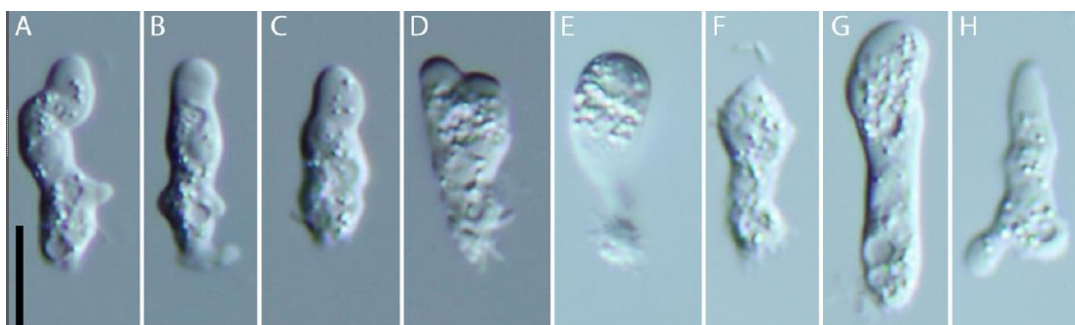
Jedná se o sladkovodní nahou amébu, jejíž délka v pohybu je průměrně 25,6  $\mu\text{m}$  a šířka 5,5  $\mu\text{m}$ . Na přední části buňky se nachází hyalinní čepička ve tvaru tenkého půlměsíce. Na druhém konci buňky je viditelný vilózní baňatý uroid. Jádro má améba pouze jedno (3,4  $\mu\text{m}$ ) vezikulárního tvaru s centrálním jádérkem. Mitochondrie obsahují rovné tubulární kristy, které se nevětví a jsou uspořádány v pravidelných rovnoběžných skupinách. U tohoto druhu nebyly pozorovány zřetelné plovoucí formy ani stádium cysty. Poprvé byl druh *Ptolemeba bulliensis* (jako *Saccamoeba* sp.) izolován z žaber *Salmo salar* v roce 2000 (řeka Labe, ČR) jako kmen LOS7N (Dyková, 2002). Později byl v roce 2013 izolován kmen Sk134e z ornice v kampusu State University ve státě Mississippi (USA), určen také jako druh *Ptolemeba bulliensis* (Watson, 2014).



Obrázek 18: *Ptolemeba bulliensis* (Watson, 2014)

### Druh *Ptolemeba noxubium* Brown et al., 2014

Tento nový druh je popsán jako sladkovodní nahá monotaktická améba, jejíž délka v pohybu je průměrně 18,8  $\mu\text{m}$  a šířka 6,0  $\mu\text{m}$ . Na přední části buňky se nachází hyalinní čepička ve tvaru tenkého půlměsíce. Na druhém konci buňky je viditelný vilózní baňatý uroid. Améba je jednojaderná s centrálním jadérkem. Jádro má vezikulární tvar a průměr 3,9  $\mu\text{m}$ . Mitochondrie obsahují tubulární kristy, které jsou nepravidelně uspořádány. U tohoto druhu nebyly pozorovány zřetelné plovoucí formy ani stádium cysty (Watson, 2014).



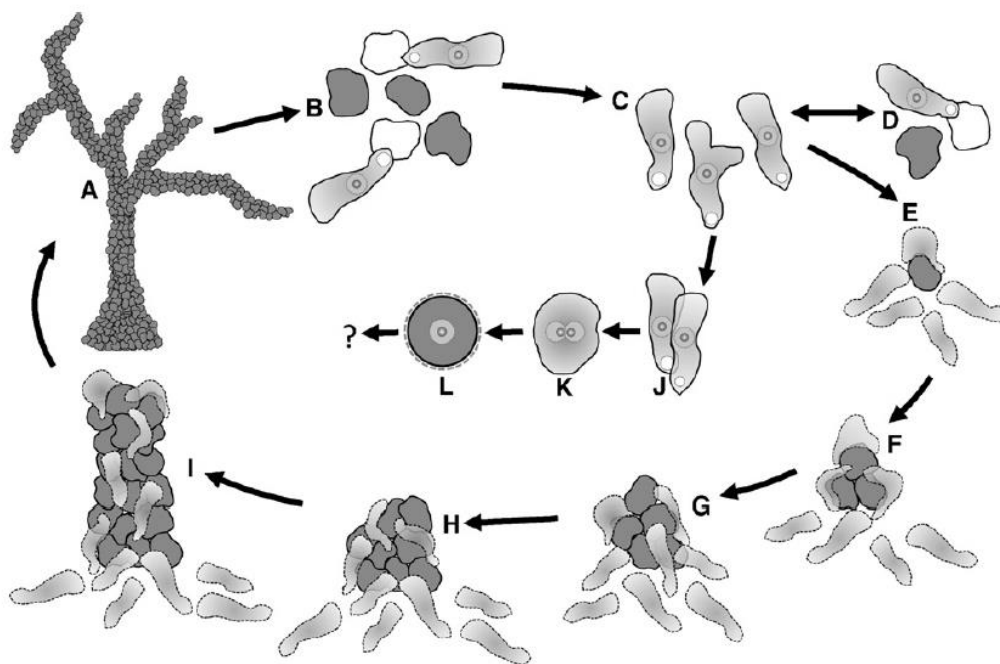
Obrázek 19: *Ptolemeba noxubium* (Watson, 2014).

### Rod *Copromyxa* Zopf, 1885

V roce 1883 popsal Fayod plodničky hlenky s amébami limaxového typu, které zařadil do rodu *Guttulina* a pojmenoval je *G. protea*. Organismus byl nalezen na hnoji koní a krav a byl popsán jako žlutavě bílý se sorokarpy, které se rozpadají na jednotlivé spory. Spory v sorokarpu se lišily, měly oválný, podlouhlý, někdy až trojúhelníkovitý tvar. Byly popsány i mikrocysty coby kulaté buňky se zdrsňenými stěnami.

V druhu *Guttulina* byly morfologické rozdíly mezi jednotlivými buňkami, což vedlo k myšlence vytvořit nový rod *Copromyxa* a druh *Guttulina protea* do něj zařadit. Tento druh se tak přejmenoval na *C. protea* (Nesom & Olive, 1972).

Améby rodu *Copromyxa* jsou v aktivním pohybu monopodiální. Buňka má výraznou hyalinní čepičku a na druhé straně zužující se uroid, který není většinou diferencovaný, ale často vytváří adhezivní vlákna. V normálním případě má jedno vezikulární jádro s centrálním jadérkem. Cysty jsou tvořeny, mohou mít kulovitý, vejčitý nebo nepravidelný tvar s hladkou stěnou. U některých druhů (*Copromyxa protea*) je možný pohlavní cyklus zahrnující silnostěnné sférocysty (Obr. 20) (Brown, 2010).

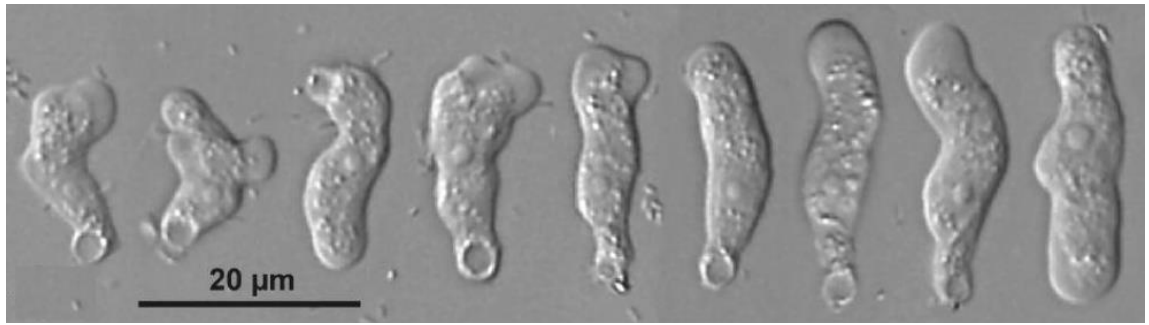


Obrázek 20: Životní cyklus *Copromyxa protea*. Světlejší barvou jsou znázorněny trofické améby, tmavší barvou cysty. A Sorokarp, který se skládá z jediného typu buněk, sorocyst. B Sorocysty klíčí jako améby. C Trofické améby s limax formou a jedním jádrem. D Améby mohou tvořit mikroscysty, které mohou klíčit jako améby. E Améby mohou tvořit celek, ve kterém základní buňka ze sorokapu vytvoří cystu a ostatní améby společně procházejí na vrchol a vytvářejí sorocysty. F – I Améby nadále procházejí nahoru sloupcem sorocyst a na vrcholu tvoří cysty. J Dvě trofické améby pravděpodobně podstupují plazmogamii. K Následuje karyogamie. L Tvoří se silnostěnné sférocysty. Výsledné stádium života, které následuje po vyklíčení sférocyst, není známo. (Brown, 2010).

#### Druh *Copromyxa protea* Fayod, 1883

Druh *Copromyxa protea* byl původně popsán jako *Guttulina protea* Fayod (1883). Jedná se o améboidní organismus, jehož habitatem je hnůj. Tento organismus vytváří jednoduché makroskopické struktury, nazývané sorokarpy, které jsou tvořeny jedním typem buňky. Vědci se snažili zjistit fylogenetickou pozici těchto méně známých sorokarpických prvoků a proto byly odebrány čtyři vzorky z farem skotu v USA a byl sekvenován gen pro malou ribozomální podjednotku RNA. Fylogenetické analýzy těchto dat zařadily *C. protea* do eukaryotické skupiny Amoebozoa v rámci Tubulinea. (Brown, 2010).

Již taxonomické systémy v Adl *et. al.* (2005); Cavalier-Smith (1993, 2003) navrhují přiřazení druhu *C. protea* do taxonu Tubulinea na základě podobnosti amébových stádií *C. protea* s některými amébami z rodu *Hartmannella* (Brown, 2010).



Obrázek 21: *Copromyxa protea* (Dyková a Kostka, 2013).

#### Druh *Copromyxa cantabrigiensis* Page, 1974

Tento druh je popsán níže v rámci rodu *Hartmannella*.

#### Rod *Copromyxella* Raper, 1978

Raper (1978) popsal nový rod *Copromyxella*, společně se čtyřmi druhy, které jej tvoří (*C. silvatica*, *C. filamentosa*, *C. spicata* a *C. coralloides*). Tento rod se více než jakýkoli dosud známý rod podobá rodu *Copromyxa*, ale liší se od něj v důležitých znacích, jako jsou menší rozměry buněčných elementů. Všechny 4 druhy mají jádra s centrálně umístěnými jadérky a všechny postrádají pulzující vakuolu. Taxonomicky patřil tento rod nejdříve do čeledi Acrasidae společně s *Copromyxa* (Page, 1985). Později byl ale přearazen do čeledi Hartmannellidae, stejně tak jako rod *Copromyxa*.

#### **5.3.1 Rozpad rodu *Hartmannella* Page, 1967**

Rod *Hartmannella* byl charakterizován Pagem (1988) jako rod zahrnující améby, které jsou široce rozšířené ve sladké vodě, ale jsou známy i mořské druhy. Pohybová forma je monopodiální s výraznou přední hyalinní zónou. Pohyb je plynulý, neeruptivní. Cytoplazma nevykazuje známky nápadných krystalů, často je ale přítomno velké množství malých krystalků. Většinou buňka obsahuje pulzující vakuoly. Améby mají kulovitý, nebo mírně oválný tvar a vytvářejí hladké dvojrstevné cysty. Glykokalyx bývá tenký. Některé améby



mají na povrchu kalíškovité struktury. Mitochondrie jsou většinou protáhlé v profilu (Page, 1988).

Rod *Hartmannella* se však ukázal být polyfyletický a později se na základě molekulárních metod zjistilo, že zástupci původně patřící do toho rodu, patří do rodů jiných (stávajících, nebo nově vytvořených). Postupem času tak došlo k rozpadu rodu *Hartmannella*, na druhou stranu čeleď Hartmannellidae získala nové rody (Brown, 2010).

### 5.3.1.1 Druh „*Hartmannella*“ *cantabrigiensis* Page, 1974

Tento druh získaný ze dvou sladkovodních zdrojů v Cambridge byl původně popsán Pagem (1974) jako *Hartmannella cantabrigiensis*. V nedávné době bylo ale na základě multigenové analýzy tohoto druhu zjištěno, že druh *Hartmannella cantabrigiensis* je velmi blízce příbuzný druhu *Copromyxa protea*. Díky tomuto novému zjištění blízké příbuznosti rodů, bylo navrženo přejmenování *Hartmannella cantabrigiensis* na *Copromyxa cantabrigiensis* (Brown, 2010) a tak byl druh *H. cantabrigiensis* přerazen do rodu *Copromyxa*.

Popis druhu však zůstal zachován tak, jak ho původně definoval Page (1974). Pohybová forma améby má délku zhruba 23  $\mu\text{m}$  a cystu v průměru 8,8  $\mu\text{m}$ . Jádro má nepravidelný okraj, bez vnitřních vláknitých lamin. V jádru se nachází centrální jádérko. Mitochondrie jsou oválné až protáhlé v profilu, s tubulárními kristami, které mají v průměru okolo 50 nm a jsou spíše zřídka větvené. Golgiho aparát se nachází blízko jádra a skládá se nejčastěji ze 4 váčků. U této améby nebyly zaznamenány žádné endocytické bakterie (Page, 1985).



Obrázek 22: *Copromyxa cantabrigiensis* (Dyková & Kostka, 2013).

### 5.3.1.2 Druh „*Hartmannella*“ *vermiformis* Page, 1967

Druh *Hartmannella vermiformis* byl popsán Pagem (1967) ze dvou vzdálených lokalit v USA. Tyto améby jsou 12 – 33  $\mu\text{m}$  dlouhé a jejich cysty měří v průměru 6  $\mu\text{m}$ . U tohoto druhu nebyly pozorovány žádné opticky aktivní inkluze. Jádro nemá vnitřní vláknitou laminu. Mitochondrie jsou oválné až protáhlé v profilu, s maximální délkou 1.1  $\mu\text{m}$ , ale častěji kratší. Kristy jsou tubulární, v průměru měří asi 46 nm, jejich větvení nebylo zjištěno. U tohoto druhu nebyly pozorovány žádné endocytické bakterie. Buňky tvoří cysty, jejichž stěna má strukturu velmi jemných vláken. (Page, 1967).

*Hartmannella vermiformis* se ve všech publikovaných fylogenetických stromech kontrovaných na základě analýzy sekvencí řadila k rodu *Echinamoeba*, i když by se podle očekávání měla řadit k ostatním hartmannellidům. Ve skutečnosti se od nich tento druh výrazně liší. Její tvar je spíše červovitý s tendencí se větvit při změně směru pohybu. Pro zdůraznění rozdílu byl vytvořen nový rod *Vermamoeba* a čeleď Vermamoebidae (v rámci řádu Echinamoebida) a druh *Hartmannella vermiformis* do něj byl přemístěn a přejmenován na *Vermamoeba vermiformis* (Smirnov, 2011).



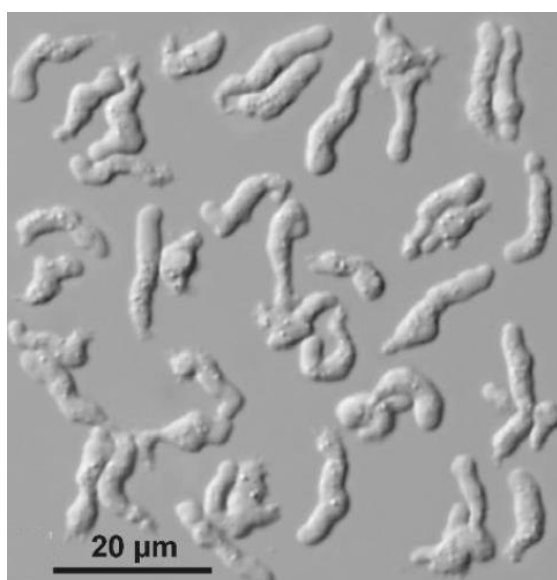
Obrázek 23: *Vermamoeba vermiformis* (Dyková & Kostka, 2013).

### 5.3.1.3 Druh „*Hartmannella*“ *abertawensis* Page, 1980

Jedná se o mořskou amébu, popsanou Pagem (1980) a získanou ze břehu Bristol Channel, jejíž délka je v průměru 11.5  $\mu\text{m}$ . Byla zjištěna podobnost jader této améby s *H. vermiformis*, i když každý druh obývá jiný habitat. Nebylo zpozorováno, že by *H. abertawensis* vytvářela cysty. (Page, 1980).

Později se ve fylogenetických analýzách objevoval druh *H. abertawensis* na samostatné větvi spolu se zástupci rodu *Nolandella*. Page (1983) uvedl jako charakteristický znak nollandely určitou erupivní aktivitu a na povrchu améby buněčný plášť, avšak žádný z těchto znaků není definitivní. Příležitostný erupivní pohyb pozoroval A. Smirnov (2011) během jeho pozorování druhu *Hartmannella abertawensis*.

Druhy *Nolandella hibernica* a *H. abertawensis* jsou si velmi podobné a významně se liší od *Hartmannella* a *Saccamoeba*, proto byl vytvořen nový řád *Nolandida* se samostatnou čeledí *Nolandellidae*, do které byl druh *H. abertawensis* přemístěn a přejmenován na *Nolandella abertawensis* (Smirnov, 2011).



Obrázek 24: *Nolandella abertawensis* (Dyková & Kostka 2013).

## 6 METODIKA - VLASTNÍ FYLOGENETICKÉ ANALÝZY

### 6.1 Zpracování sekvenčních dat

Pro vytvoření fylogenetických stromů mi byly poskytnuty sekvence získané Laboratoří rybí protistologie AV ČR (Tab. I) a dále jsem použila veřejně dostupné sekvence z genové banky GenBank získané prostřednictvím NCBI. Ze všech analyzovaných sekvencí jsem následně vytvořila datasey. Kvůli eliminaci rizika přitahování dlouhých větví byly vytvořeny dva datasey (jeden se sekvencemi tvořícími dlouhé větve a druhý bez nich), tudíž i dvě fylogenetické analýzy. Fylogenetické analýzy byly založeny pouze na sekvencích SSU rRNA, které v dnešní době tvoří nejčastější zdroj dat pro vytváření našich představ o fylogenetických vztazích. Dataset jsem vložila do programu ClustalX (Larkin *et al.*, 2007), kde byly sekvence alignovány. V programu BioEdit (Hall, 1999) byl vzniklý alignment ještě ručně upraven (vymazáním lišících se, těžko alignovatelných, částí).

Pro konečné vytvoření fylogenetických analýz jsem využila dvě metody: Maximum Likelihood (ML) a Bayesovskou interferenci (BI). Aby mohly být vytvořeny fylogenetické analýzy za pomoci metody Maximum Likelihood, byl použit program RAxML 8.0.20 (Stamatakis, 2006), využívající modelu GTRGAMMAI (GTR – nejobecnější model evoluce; GAMMA – gamma distribuce; I – proporce invariantních míst). Analýzy, které využívaly metodu Bayesovské interference, byly spuštěny v programu MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) s výchozím modelem GTR. Délka MCMC řetězce byla milión generací; BurnIn byl nastaven na 25 % stromů, které vznikly během analýzy. Všechny vzniklé fylogenetické stromy jsem ještě dále upravovala v programu TreeView (Page, 1996).

Tabulka I: Soupis vzorků použitých pro fylogenetické analýzy poskytnuté Laboratoří rybí protistologie AV ČR.

Název kmene	Rod (byl-li před analýzou znám)	Místo sběru	Lokalita
RT1TT		Vlhký písek	Kostarika
JKS1		Plážový písek	Jižní Korea
AFSM9	<i>Nollandella sp.</i>	<i>Scophthalmus maximus</i> / žábry	Španělsko
ISO14	<i>Flabelulla sp.</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i> / žábry	Sicílie
S5M32	<i>Flabelulla sp.</i>	<i>Scophthalmus maximus</i> / žábry	Španělsko
S3M27	<i>Flabelulla sp.</i>	<i>Scophthalmus maximus</i> / žábry	Španělsko
SBGL1	<i>Flabelulla sp.</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i> / žábry	Sicílie
CCAP1529/4	<i>Flabelulla trinovantica</i>	Sbírkový kmen (CCAP)	
HF1KJ		<i>Heteropneustes fossilis</i> / játra	import
4389		<i>Tinca tinca</i> /játra	Česká republika
HF3KL		<i>Heteropneustes fossilis</i> / ledviny	import
1HFKJ		<i>Heteropneustes fossilis</i> / játra	import
CC4HA		<i>Cyprinus carpio</i> / játra	Spolský
MSED6	<i>Saccamoeba sp.</i>	sediment z akvária	Česká republika
ZEB4	<i>Copromyxa</i>	<i>Danio renio</i> / játra	Španělsko
ZEB1	<i>Copromyxa</i>	<i>Danio renio</i> / žábry	Španělsko
ALC3	<i>Hartmannella</i>	strouha podél silnice	Tenerife
LUM	<i>Copromyxa</i>	žížala	Česká republika
W187G	<i>Saccamoeba sp.</i>	<i>Carassius gibelio</i> / žábry	Baoan Lake, Čína
DP7	<i>Saccamoeba sp.</i>	<i>Dreissensia polymorpha</i> / hepatopankreas	Česká republika
PV67		Pivní lahev před recyklací	Česká republika
LOS7N/I	<i>Saccamoeba sp.</i>	<i>Salmo salar</i> / žábry	Česká republika
4394	<i>Hartmannella</i>	<i>Scardinius erythrophthalmus</i> / játra	Lužnice E8
ECH26	<i>Hartmannella</i>	<i>Sphaerechinus granularis</i> / hemolymfa	Chorvatsko
PM11	<i>Hartmannella</i>	mechovka <i>Pectinatella magnifica</i>	Česká republika
CAL5		<i>Carassius auratus</i> / ledviny	Česká republika
MSED2		sediment z akvária	Česká republika
CAL7		<i>Carassius auratus</i> / ledviny	Česká republika
PPD16		hvězdice <i>Porania pulvillus</i>	Norsko
P18		<i>Calophysus</i>	Peru
BCHM5		<i>Bunocephalus coracoideus</i> / játra	Brazílie
W185G		<i>Carassius gibelio</i> / žábry	Baoan Lake, Čína
4790		<i>Cottus gobio</i> / slezina	Zlatý potok, Protivec
CCAP1519	<i>Echinamoeba</i>	Sbírkový kmen (CCAP)	

## 6.2 Výsledky a diskuze

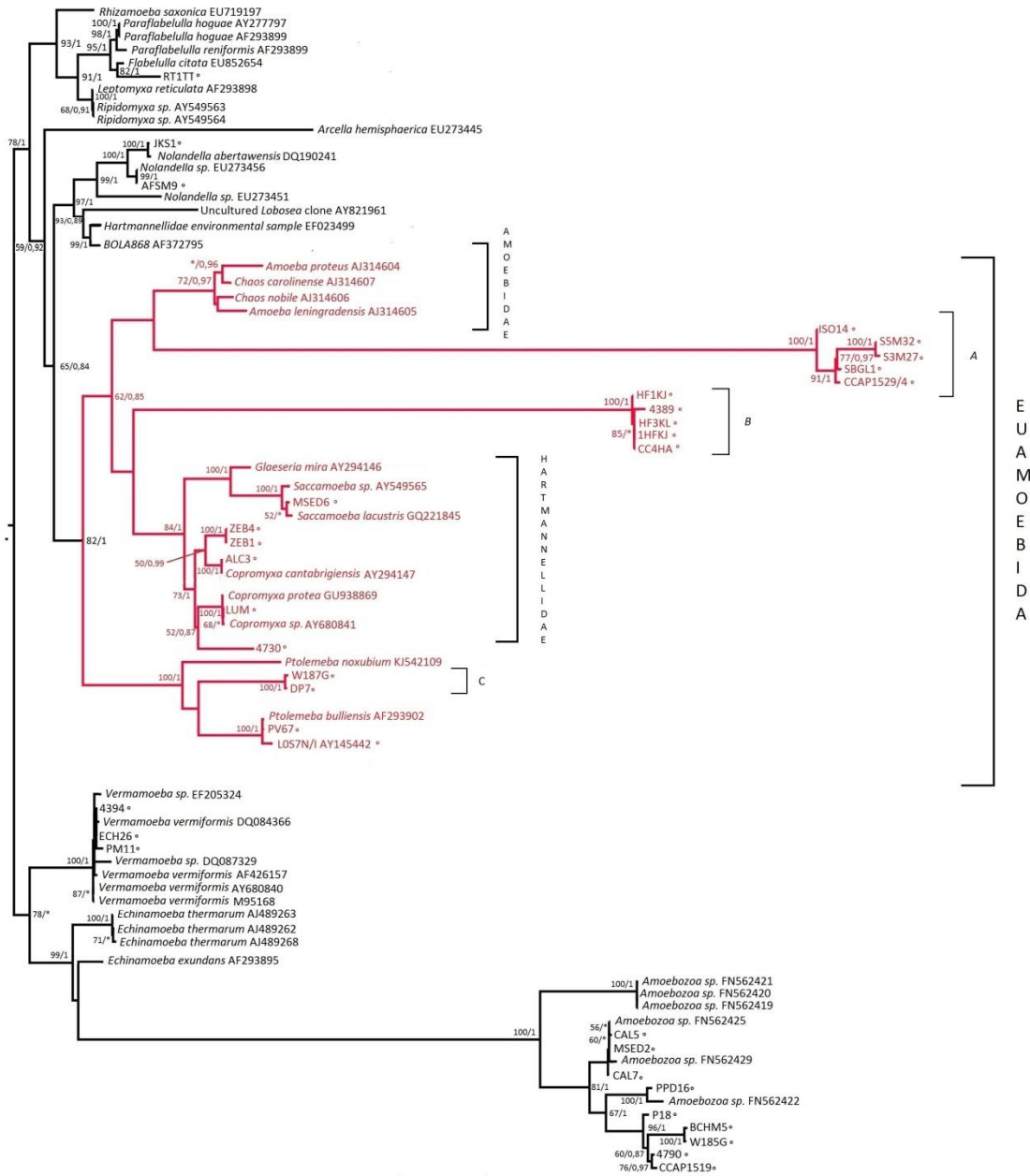
V první fylogenetické analýze s dlouhými větvemi (Obr. 25) se objevují kromě dobře známých skupin (zastoupených i mnoha kmeny izolovanými Laboratoří rybí protistologie), dokumentovaných studiemi mnoha autorů (Lahr, 2013; Watson, 2014; Dyková, 2008), i nové, dosud nepublikované linie A, B a C.

Linie A je skupina flabellulidních améb, která nám svojí pozicí naznačuje rozdělení čeledi Flabellulidae do několika skupin: další zástupci čeledi Flabellulidae se větví bazálněji, viz horní část obrázku 25. Z této analýzy není jasné, kam tuto linii flabellulidních améb zařadit, zda patří do skupiny Flabellulidae, či k rodům *Chaos* a *Amoeba*. Tímto tématem se už ale ve svých pracích zabývá Martina Jedličková (Jedličková, 2015), proto se zde této linii již nebudu věnovat.

Větev s označením B je linie nově objevených améboidních organismů patřících do skupiny Euamoebida. Organismy byly izolovány laboratoří rybí protistologie AV ČR, která mi poskytla hotové sekvence pro následnou analýzu. Organismy zatím nebyly blíže popsány, tudíž ani pojmenovány, ale jsou zdokumentovány v publikaci Dyková a Kostka (2013). Doposud byla sekvenována pouze jejich RNA (SSU rRNA) a následně provedena fylogenetická analýza, která zařadila tyto organismy jako sesterskou linii k zástupcům čeledi Hartmannellidae.

Větev C je nově vzniklá linie améb (dvou kmenů: W187G, DP7) v rámci rodu *Ptolemeba*. Jedná se o nedávno objevené améby, které ještě nebyly blíže popsány, byla pouze osekvenována jejich RNA laboratoří rybí protistologie AV ČR. Améby rodu *Ptolemeba* dříve patřily do rodu *Saccamoeba*, jehož zástupci se ale objevovali v několika liniích (byl polyfyletický), proto byla nutná revize tohoto rodu. Zástupci větve C mají mitochondrie s podobně utvářenými kristami jako *P. bulliensis* (viz Dyková & Kostka, 2013), jíž jsou bližší i v provedené analýze.

Za zmínku stojí též pozice kmenů 4730 a ZEB1 a ZEB4, které odpovídají novým druhům v rámci rodu *Copromyxa*. Kmen 4730 byl na základě morfologických znaků popsán jako *Vexillifera expectata* (Dyková *et al.*, 1998), ale molekulární data ukazují, že jeho příbuzenské vztahy jsou odlišné.



Obrázek 25: Fylogenetická analýza s dlouhými větvemi založená na sekvencích genu pro SSU rRNA s doplněnými posteriorními pravděpodobnostmi (0,8-1) vypočtenými pomocí BI a bootstrapovými podporami (50-100) vypočítanými pomocí ML (pokud nebylo dosaženo prahu pro BI (0,8) a pro ML (50) v jedné z hodnot, hodnota nahrazena symbolem hvězdičky). Sekvence získané Laboratoří rybí protistologie AV ČR označeny symbolem °, sekvence získané z databáze NCBI označeny příslušných kódem. Ve fylogenetické analýze označeny nově vzniklé skupiny, linie A, B, C.

Ve druhé fylogenetické analýze (Obr. 26), z jejíhož datasetu byly odebrány dlouhé větve kvůli eliminaci rizika jejich přitahování (včetně flabelul ze skupiny A), se tedy objevují pouze nové linie B a C. Nově vzniklá linie B se nyní ukázala být sesterskou skupinou k amébám rodu *Ptolemeba*

Hodnoty posteriorních pravděpodobností a bootstrapových podpor se v obou stromech nějak výrazně neliší. Fylogenetické analýzy s dlouhými větvemi a bez nich se však liší pozicí nově vzniklé skupiny B. V první fylogenetické analýze byla skupina B lokalizována na bázi rodů *Glaeseria*, *Saccamoeba* a *Copromyxa*, kdežto ve druhé analýze vytváří sesterskou skupinu k rodu *Ptolemeba*. Toto rozdílné umístění skupiny mohlo být zapříčiněno přitahováním k dlouhé linii A (v první fylogenetické analýze), která byla ve druhé analýze záměrně odstraněna. Statistická podpora vyjádřená formou bootstrapových hodnot resp. posteriorní pravděpodobnosti však není ani v jednom případě vysoká a postavení skupiny B je tedy nejisté.

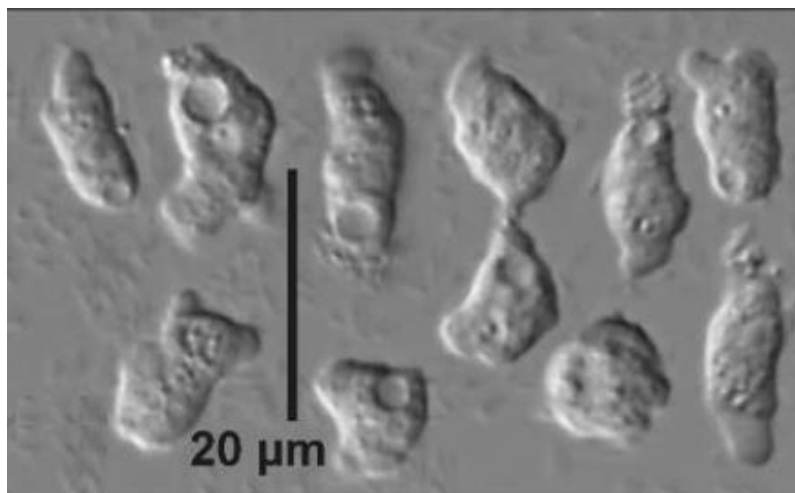
Na obrázcích 27 a 28 jsou vyobrazeni zástupci linií B a C.



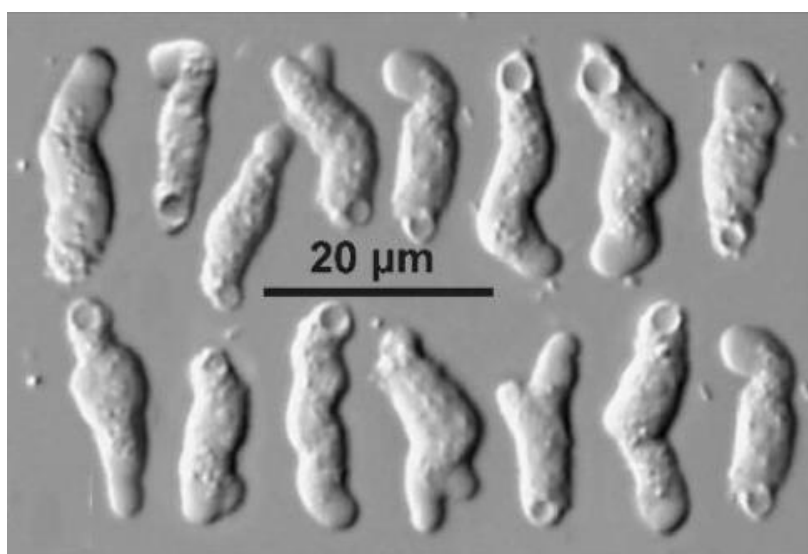
Obrázek 26: Fylogenetická analýza bez dlouhých větví založená na sekvencích genu pro SSU rRNA s doplněnými posteriorními pravděpodobnostmi (0,8-1) vypočtenými pomocí BI



a bootstrapovými podporami (50-100) vypočítanými pomocí ML (pokud nebylo dosaženo prahu pro BI (0,8) a pro ML (50) v jedné z hodnot, hodnota nahrazena symbolem hvězdičky). Sekvence získané Laboratoří rybí protistologie AV ČR označeny symbolem °, sekvence získané z databáze NCBI označeny příslušným kódem. Ve fylogenetické analýze označeny nově vzniklé skupiny, linie A, B.



Obrázek 27: Kmen CC4HA (Dyková & Kostka 2013).



Obrázek 28: Kmen W187G (Dyková & Kostka 2013).

## 7 ZÁVĚR

Na rozdíl od velikých a nápadných zástupců čeledi Amoebidae jsou améby čeledi Hartmannellidae velice uniformní organismy. Jejich identifikace a zařazení do určitého taxonu pouze na základě morfologických znaků je proto velice obtížná. Až s postupem času v rozmezí několika desetiletí a s rozvojem nových vědeckých technologií se začalo dařit identifikovat jednotlivé druhy a zařadit je tak do správného rodu. Vytvoření správné taxonomie skupiny Euamoebida (a Amoebozoa vůbec) se daří až v dnešní době za použití metody sekvenování, zejména genů pro 18S rRNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA). Na základě sekvenace genů se ukázalo dosavadní zařazení některých druhů chybné, muselo tak dojít k revizím určitých rodů. Některé rody v tradičním pojetí byly polyfyletické (*Saccamoeba*, *Hartmannella*), proto bylo nutné jejich zástupce přeradit do rodů jiných nebo nově vytvořených.

V mnou provedených fylogenetických analýzách vytvořených mimo jiné z poskytnutých sekvencí Laboratoře rybí protistologie se objevily nové linie právě mezi zde studovanými kmeny améb. Zástupci nově vytvořených linií (na úrovni druhů i rodů) dosud nebyli blíže popsáni, tudíž ani pojmenováni. Bylo by proto potřeba tyto kmeny v nejbližší době detailněji prostudovat.

V dnešní době nejsou zdaleka popsány a zařazeny všechny Amoebozoa. Neustále dochází k izolacím nových kmenů, které je potřeba detailněji prostudovat a popsat. Nepochybně se budeme setkávat ještě s mnoha změnami v jejich taxonomii, jak s objevováním celých nových linií, tak i se špatně zařazenými zástupci, které bude nutné přeradit do jiné skupiny.

## 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.

Bovee, E.C. (1985). The lobose amebas III. Description of nine new conopodous amoebae of the genus *Vexillifera* Schaeffer, 1926 emend. Bovee, 1951, 1970 with comments on the genus. *Archiv für Protistenkunde*. 129: 101-118.

Brown, M. W., Silberman, J. D., & Spiegel, F. W. (2010). “Slime molds” among the Tubulinea (Amoebozoa): molecular systematics and taxonomy of Copromyxa. *Protist*, 162, 277-287.

Cavalier-Smith, T. (2004). Only six kingdoms of life. *Proceedings of the Royal Society of London-B*, 271, 1251-1262.

Cavalier-Smith, T., & Chao, E. E. (1998). Hyperamoeba rRNA phylogeny and the classification of the phylum. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 5A Hausmann, K., &

Corsaro, D., Michel, R., Walochnik, J., Müller, K., Greub, G. (2010). *Saccamoeba lacustris*, sp. nov. (Amoebozoa: Lobosea: Hartmannellidae), a new lobose amoeba, parasitized by the novel chlamydia ‘*Candidatus Metachlamydia lacustris*’ (Chlamydiae: Parachlamydiaceae). *European Journal of Protistology* 46, 86–95.

Dyková, I., & Kostka, M. (2013). Illustrated Guide to Culture Collection of Free-living Amoebae. Praha: Academia.

Dyková, I., Lom, J., Macháčková, B., Pecková, H. (1998). *Vexillifera expectata* sp. n. and other non-encysting amoeba isolated from organs of freshwater fish. *Folia Parasitologica* 45, 17 – 26.

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., Veverková, M., Fiala, I., Macháčková B. (2002). A Free-Living Amoeba with Unusual Pattern of Mitochondrial Structure Isolated from Atlantic Salmon, *Salmo salar* L.. *Acta Protozoologica* 41: 415 - 419

Goodkov, A. V., Smirnov, A.V., Skovorodkin, I. N. (1999). Study of a rediscovered large freshwater multinucleate amoeba *Chaos illinoisense* (Kudo, 1950). St. Peterburg: Biological Research Institute of St. Petersburg State University. *Protistology* 1 (2), 55-61.

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.

Jahn, T. L., Bovee, E. C. (1965). Movement and locomotion of microorganisms. Los Angeles: University of California.

Jedličková, M. (2015). Fylogeneze améb čeledi Flabellulidae, České Budějovice: Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta.

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.

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.

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.

Leidy, J. (1879). Fresh-water rhizopods of North America. U.S. Geol. Surv. Terr. Rep. 12: 1–324, 48 pl.

Letková, V., Goldová, M., & Kočíšová, A. (2010). Základy protozoologie. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciách.

Mrva, M. (2010). Morphological studies on two rare soil amoebae *Deuteramoeba algonquinensis* and *D. mycophaga* (Gymnamoebia, Amoebidae). Bratislava: Comenius University. *Protistology* 6 (4), 284–289.

Nesom, M.; Olive, L. S. (1972). *Copromyxa arborescens*, a New Cellular Slime Mold. Chapel Hill: University of North Carolina. *Mycologia*, Vol. 64, No. 6, 1359-1362.

Page, F.C. (1967). Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of Hartmannella and 3 of Vahlkampfia. Madison: University of Wisconsin. *Protozoologica* 14 (3), 499 – 521.

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. (1974). *A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of new species and a key to genera*. Cambridge: Culture centre of Algae and Protozoa. *Archiv für Protistenkunde*, 116, 149 – 184.

Page, F. C. (1983). Marine gymnamoebae. Cambridge: Institute of Terrestrial Ecology.

Page, F.C. (1985). The limax amoebae: comparative fine structure of the hartmannellidae (lobosea) and further comparisons with the Vahlkampfiidae. Cambridge: Institute of Terrestrial Ecology. *Protistologica*, T. XXI, fasc 3, 361- 383.

Page, F.C. (1986). The genera and possible relationships of the family amoebidae, with special attention to comparative ultrastructure. Cambridge: Institute of Terrestrial Ecology. *Protistologica*, T XXII, fasc 3, 301 – 316.

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.

Raper, K. B.; Worley, A. C.; Kurzynski, T. A. (1978). Copromyxella: A new genus of Acrasidae. Madison: University of Wisconsin and State laboratory of hygiene. *American Journal of Botany*, Vol. 65, No. 9, 1011-1026.

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

Siemensma, F.J. & Page, F.C. 1986. A light- and electron-microscopical study of *Trichamoeba sinuosa* n. sp. (Amoebida) with a re-diagnosis of the genus.. *Protistologica* 22: 117-125.

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.

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., Nassonova, 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.

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

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.

## URL

URL 1: Pseudopodia. *Microworld world of amoeboid organisms*. [online]. 21.7.2015 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.arcella.nl/pseudopodia>.

URL 2: Amoeba. *Microworld world of amoeboid organisms*. [online]. 21.7.2015 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.arcella.nl/amoeba>.

URL 3: Chaos. *Microworld world of amoeboid organisms*. [online]. 21.7.2015 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.arcella.nl/chaos>.

URL 4: Polychaos dubium. *Microworld world of amoeboid organisms*. [online]. 21.7.2015 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.arcella.nl/polychaos-dubium>.

URL 5: Deuteramoeba. *Microworld world of amoeboid organisms*. [online]. 21.7.2015 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.arcella.nl/deuteramoeba>.

URL 6: Trichamoeba. *Microworld world of amoeboid organisms*. [online]. 21.7.2015 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.arcella.nl/trichamoeba>.

URL 7: Parasitic amoeba. *Corbis images*. [online]. 21.6.2010 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.corbisimages.com/stock-photo/rights-managed/42-26632670/parasitic-amoeba-hydramoeba-hydroxena-lm>.

URL 8: Cashia. *Live journal*. [online]. 24.10.2014 [cit. 2015-11-23]. Dostupné z: <http://scienceblogger.livejournal.com/255587.html>.

URL 9: *Protist information server*. [online]. 2.5.2015 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: [http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/sarcodina/Glaeseria/sp\\_1.jpg](http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/sarcodina/Glaeseria/sp_1.jpg).

URL 10: *Saccamoeba stagnicola*. *Microworld world of amoeboid organisms*. [online]. 21.7.2015 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.arcella.nl/saccamoeba-stagnicola>.

URL 11: *Saccamoeba limax*. *Microworld world of amoeboid organisms*. [online]. 21.7.2015 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.arcella.nl/saccamoeba-limax>.