

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Protistologie



Mgr. Bc. Ondřej Pomahač

Diverzita a fylogeneze metopidních nálevníků patřících do skupiny IAC

The diversity and phylogeny of metopid ciliates of the IAC group

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Ivan Čepička, Ph. D.

Konzultantka: RNDr. Johana Rotterová, Ph. D.

Praha, 2021

Prohlášení

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

V Praze dne 9. 8. 2021
Ondřej Pomahač

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli Ivanu Čepičkovi za odborné vedení, všechny nápady, rady a usměrnění, a nakonec také za to, že mi jako „věčnému studentovi“ dal šanci ve své laboratoři. Dále bych chtěl poděkovat J. Rotterové a W. Bourlandovi za ochotné a trpělivé předání znalostí a zaučení do laboratorních metod. Děkuji i D. Méndez-Sánchezovi za neocenitelnou pomoc při získávání a zpracování dat. V neposlední řadě děkuji i všem obětavým a štědrým dodavatelům vzorků, bez jejichž pomoci by tento výzkum nebyl možný.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	5
1 Úvod a cíle	6
2 Literární přehled	8
2.1 Třída Armophorea	8
2.2 Historie rodu <i>Metopus</i> a morfologická taxonomie metopidů.....	9
2.3 Základní morfologie metopidů	13
2.4 Aktuální taxonomie a fylogenetika skupiny IAC	15
2.5 Seznam volně žijících zástupců skupiny IAC publikovaných s molekulárními daty	18
2.6 Ekologie metopidů ze skupiny IAC.....	19
3 Materiály a metody	20
3.1 Vzorky a kultury	20
3.1.1 Vzorky, kultivace a média	20
3.1.2 Příprava umělého anoxického prostředí	21
3.2 Světelná mikroskopie	21
3.2.1 Přípravy a pozorování živých buněk	21
3.2.2 Barvení protargolem	21
3.2.3 Barvení uhličitanem stříbrným	22
3.3 SEM (skenovací elektronová mikroskopie)	22
3.4 Molekulární metody	22
3.4.1 Izolace DNA.....	22
3.4.2 Amplifikace DNA, elektroforéza a purifikace amplifikovaných produktů	23
3.5 Analýza sekvencí.....	25
3.5.1 Editace sekvencí, dataset a příprava alignmentu.....	25
3.5.2 Fylogenetická analýza genu pro 18S rRNA	25
4 Výsledky.....	26
4.1 Vzorky a kultivace.....	26
4.2 Fylogenetická analýza skupiny IAC na základě genu pro 18S rRNA.....	28
4.3 Identifikovaná diverzita a podpořené linie.....	30
4.4 Morfologické představení nalezené diverzity	30
4.5 Detailní popis metopida ze skupiny IAC	48
4.6 Nově objevené linie blízkce příbuzné druhu <i>Metopus es</i>	54
5 Diskuze.....	56
5.1 Nově nalezená diverzita a otázka odhadování reálné diverzity	56
5.2 Dříve morfologicky popsání pravděpodobní zástupci skupiny IAC	57
5.3 Fylogenetická analýza IAC, gen pro 18S rRNA a jeho limity	58
5.4 Obtíže s barvením metopidů ze skupiny IAC.....	59

5.5 Možnosti využití „direct PCR“	60
5.6 Úskalí a budoucnost morfologie v taxonomii metopidů	60
5.6.1 Příklad <i>Metopus laminarius</i> aneb záměna	61
5.6.2 Příklad <i>Metopus hasei</i> aneb sběrný taxon	64
5.6.3 Příklad <i>Metopus minor</i> a <i>Longitaenia gibba</i>	65
5.6.4 Jaké znaky mají smysl?	66
5.7 Ekologie a habitaty	68
6 Závěr	70
7 Seznam literatury	71

Abstrakt

Skupina IAC (Armophorea: Metopida: Metopidae) zahrnuje volně žijící i endosymbiotické anaerobní nálevníky. Tato práce se věnuje diverzitě volně žijících zástupců, tzv. metopidům. Nejprve zasazuje skupinu IAC do systému a probírá historii taxonomie stěžejního druhu *Metopus*. Představuje známou diverzitu a nepřehlednou taxonomickou situaci. V rámci průzkumu diverzity se podařilo zajistit z různých anaerobních habitatů a lokalit více než 30 izolátů ze skupiny IAC. Provedená fylogenetická analýza skupiny IAC je založena na genu pro 18S rRNA a ukazuje bohatou diverzitu nových linií. Vedle skupiny IAC je prezentována ještě jedna linie nově nalezených metopidů. Pro morfologickou charakteristiku byla využita světelná mikroskopie včetně barvicích technik a skenovací elektronová mikroskopie. Práce se detailně věnuje popisu jedné vybrané linie na úrovni druhu. V obsáhlejší diskuzi jsou interpretovány výsledky, poukázáno na meze zvolených metod a rozplétána chaotická situace dosud popsaných druhů skupiny IAC s návrhy na řešení pro budoucí taxonomickou praxi při popisu metopidů.

Klíčová slova: anaerobní nálevníci, skupina IAC, *Metopus*, diverzita, taxonomie

Abstract

The IAC group (Armophorea: Metopida: Metopidae) includes both free-living and endosymbiotic anaerobic ciliates. The thesis focuses on the diversity of free-living representatives, the so-called metopids. First, the position of the IAC group in the system is explained and the history of the taxonomy of the core species *Metopus* is presented. Then the taxonomic confusion surrounding this group is depicted. For diversity research more than 30 isolates from the IAC group were obtained from various anaerobic habitats and localities. The phylogenetic analysis of the IAC group is based on the 18S rRNA gene and shows a rich diversity of new lineages. In addition to the IAC group, another newly-found lineage of metopids is presented. Light microscopy, including staining techniques and scanning electron microscopy, was used to establish morphological characteristics. In the work, a detailed description of one selected lineage at the species level is performed. In the discussion, the results are interpreted, the limitations of the selected methods are pointed out and the chaotic taxonomic and phylogenetic situation of the IAC group species described. Suggestions for the improvement of future taxonomic practices in the description of metopids are offered.

Key words: anaerobic ciliates, IAC group, *Metopus*, diversity, taxonomy

1 Úvod a cíle

Metopidi (řád Metopida, třída Armophorea) jsou výhradně anaerobní a morfologicky značně diverzifikovaná skupina nálevníků, o jejíž diverzitě je toho známo stále velmi málo (z poslední doby např. Bourland et al. 2017a, b, 2018a, b, 2020; Rotterová et al. 2018; Vďačný & Foissner 2019). Metopidní nálevníci představují mimořádně zajímavý předmět současného výzkumu hned v několika ohledech. Jeden směr výzkumu sleduje jejich symbiózu s metanogenními archei (Fenchel & Finlay 1991; Beinart et al. 2018; Rotterová et al. 2020), potenciálně významnou pro globální produkci metanu (Holmes et al. 2014). Jiný směr se zaměřuje na endosymbiotickou skupinu Clevelandellida, vnitřní evoluční linii metopidů (např. Li et al. 2016, 2020; Li et al. 2018; Pecina & Vďačný 2020). Skupina Metopida je vůči klevelandelidům extrémně parafyletická, takže kdykoli je řeč o metopidech a klevelandelidech, nemluvíme o dvou sesterských liniích, ale o jedné skupině, jejíž jedna linie přešla na endosymbiotický, tj. komenzální či parazitický život uvnitř střev živočichů. V rámci řádu Metopida tvoří klevelandelidi a jejich nejbližší volně žijící příbuzní skupinu nazvanou kódovým označením IAC. Přes probíhající výzkum bude zejména z taxonomického pohledu vyžadovat skupina IAC jak v případě klevelandelidů, tak volně žijících metopidů zásadní revizi za pomoci molekulárních metod. Volně žijící metopidi ze skupiny IAC jsou nejbližšími známými příbuznými nejen endosymbiotických klevelandelidů, ale i druhé endosymbiotické linie zatím reprezentované jediným sekvenčně doloženým druhem *Parametopidium circumlabens* Aesch, 2001. Studium volně žijících linií metopidů v rámci skupiny IAC může v budoucnu pomoci odpovědět na otázky vzniku endosymbiotického způsobu života v rámci třídy Armophorea.

V této práci se zaměříme na popis a hodnocení jak diverzity dříve publikované, tak zejména nově objevených linií. Studium metopidů obecně trpí historicky vzniklou chaotickou taxonomickou situací a nedostatkem molekulárních dat. Zásadním přínosem této práce je tak už samotné získání molekulárních dat (gen pro 18S rRNA) a jejich fylogenetická analýza společně s úspěšnou kultivací izolátů. V literárním přehledu jsem se pokusil přehledně vyložit veškerou dostupnou a relevantní literaturu týkající se diverzity, taxonomie a fylogeneze metopidů ze skupiny IAC doplněnou kontextem nutným k pochopení publikovaných poznatků a způsobu jejich získávání. V diskuzi se pokoušíme stručně zhodnotit dosavadní přístupy k taxonomii metopidů, poukázat a vysvětlit četné komplikované záměny a nedorozumění plynoucí z nejčastěji používaných metod, a konečně navrhnout cestu, kterou by se další výzkum metopidů měl ubírat.

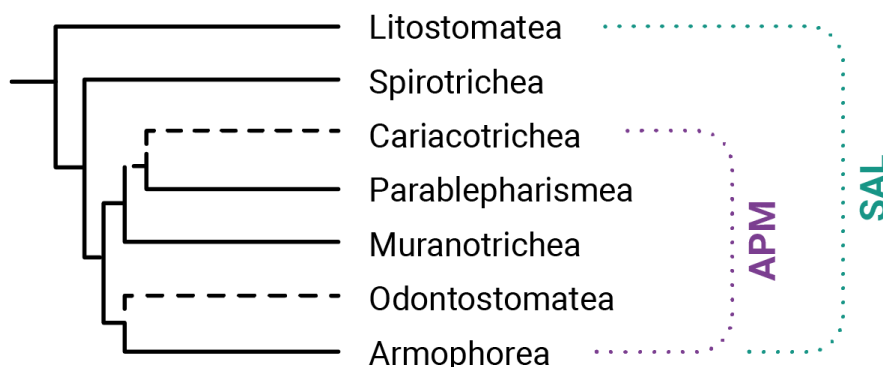
Cíle:

- zmapovat diverzitu metopidních nálevníků skupiny IAC pomocí morfologických a molekulárních metod
- vytvořit a udržet laboratorní kultury metopidů ze skupiny IAC pro další výzkum
- analyzovat vztah nově nalezených linií k již známé diverzitě na základě fylogenetické analýzy sekvencí genu pro 18S rRNA
- detailněji popsat jednu linii představující nový druh

2 Literární přehled

2.1 Třída Armophorea

Nálevníky (kmen Ciliophora) dělíme do dvou hlavních skupin (podkmenů) podle toho, zda se mikrotubuly pomáhající dělení makronukleu konstituují vně (Postciliodesmatophora), nebo uvnitř něj (Intramacronucleata). Zvláštní případ je pak třída Karyorelictea, patřící do podkmene Postciliodesmatophora, ačkoli se u ní makronukleus nedělí vůbec. Třída Armophorea patří do výrazně většího podkmene Intramacronucleata. Zde je součástí větší skupiny několika linií s názvem SAL (viz obr. 1). Tvoří ji dvě třídy Spirotrichea a Litostomatea a nově definovaná skupina APM (Rotterová et al. 2020). Ta je složena ze tříd Armophorea, Odontostomatea, Cariacotrichea, Muranotrichea a Parablepharismaea (Rotterová et al. 2020; Irwin et al. 2020). Zatímco třídy Spirotrichea a Litostomatea zahrnují převážně aerobní druhy, došlo v nich ke vzniku anaerobiózy v rámci některých dílčích linií. Třídy patřící do APM jsou pak ryze anaerobní.



Obr. 1 Schéma fylogenetických vztahů tříd nálevníků ve skupině SAL podle Rotterová et al. (2020).

Třída Armophorea byla ustavena až na základě molekulárních metod a fylogenetických analýz genu pro 18S rRNA (Silva Pavia et al. 2013). Samotný název Armophorea navržený Jankovským (Jankovskij 1964) má svůj původ podle Lynna (2008) odvozen od latinských slov „arma“, zbraň, nebo „armus“, rameno. Nicméně se domnívám, že je původně míněna „zbroj“, tedy Armophorea jako doslovný „zbrojnoš“, protože zejména armoforidi mají pevný a elaborovaný kortex připomínající brnění.

Třidu Armophorea tvoří tři řády: Armophorida a Metopida, jejichž zástupci žijí volně a jsou primárně sapropeličtí, případně bentičtí nebo planktoní, a řád Clevellandellida, jehož zástupci jsou endosymbionti trávicího traktu živočichů. Třída Armophorea nemá žádnou zjevnou synapomorfii (Lynn 2008). Společným, nikoli však výlučným, znakem je pleurokinetální stomatogeneze (Foissner &

Agatha 1999; Lynn 2008). Je to typ vzniku orální ciliatury, kdy membranely orální ciliatury dceřiné buňky vznikají z kinet somatické ciliatury mateřské buňky (Foissner & Agatha 1999). Vyskytuje se však i u fylogeneticky zcela nepříbuzné skupiny Bryometopidae (Colpodea) (Foissner 1993; Foissner & Agatha 1999), která se nachází dokonce mimo SAL (Gao et al. 2016). Pro řád Metopida a Armophorida je sice společný perizonální pruh kopírující anteriorní stranu peristomu, ten se však nenachází u klevelandellidů, u kterých zřejmě druhotně vymizel (Vďačný et al. 2019). Poslední práce navíc naznačují, že třída Armophorea možná není monofyletická a řád Armophorida možná není bezprostředně příbuzný s ostatními dvěma (Li et al. 2017; Zhuang et al. 2021). V každém případě jsou všechny tři zmíněné řády anaerobní a u metopidů a klevelandellidů je doložena proměna mitochondrií v „hydrogenozomy“, resp. vodík produkující mitochondrie, u kterých je zachován genom a které fungují v těsné symbióze s metanogenními archei (Achmanova et al. 1998; de Graaf et al. 2011; Fenchel & Finlay 2010; Beinart et al. 2018; Rotterová et al. 2020). U armoforidů (resp. caenomorfidů) jsou doloženi archeální symbionti (van Hoek et al. 2006) a spekuluje se o hydrogenozomech (Fenchel & Finlay 1991).

Dvě skupiny stěžejní pro tuto práci jsou řády Metopida a Clevelandellida. Obě skupiny se od sebe zásadně morfologicky liší. Typický metopid má oválný až protáhlý tvar buňky, obvykle s torzí nebo ohybem v anteriorní části a spiralizovanou orální ciliaturou. Nicméně morfologická variabilita v podobně rozsahu spiralizace a rozsahu orální ciliatury a konečně tvaru buňky je zde značná. Klevelandellidi mají buď jako *Nyctotherus* laterálně zploštělé tělo a adorální membranely uvnitř buňky, nebo jako *Clevelandella*, mají adorální membranely kryté tunelovitou proturzí (tzv. infundibulum) a orální část i cytoprokt se nachází na posteriorním konci buňky (Lynn 2008).

2.2 Historie rodu *Metopus* a morfologická taxonomie metopidů

Historie rodu *Metopus* je zároveň historií morfologické taxonomie metopidů. Stručnou morfologickou charakteristikou rodu *Metopus* je spiralizované tělo s pásem pěti kinet (tzv. perizonálním pruhem) na ventrální části preorálního dómu (Foissner & Agatha 1999). Typovým druhem rodu *Metopus* je *M. es*, první zaznamenaný metopid popsáný původně jako *Trichoda s* (Müller 1786). Následně znovu popsán jako *Metopus sigmoides* (Claparède & Lachmann 1858) a konečně revidován A. Kahlem jako *Metopus es* (Kahl 1927). Zatím poslední a nejpodrobnější popis tohoto druhu podle současných standardů a včetně molekulárních dat provedli až před několika lety Bourland et al. (2017a). To ostatně dobře ilustruje zanedbanost metopidů z hlediska současných taxonomických metod. Rod *Metopus* od svého zrodu sloužil jako sběrný taxon a do současné doby bylo popsáno podle některých názorů 76 (Esteban et al. 1995), podle jiných více než 80 druhů tohoto rodu (Vďačný et al. 2019). Když

pomineme různě synonymizované druhy, je jich jistě přes 100. Je navíc nutné poznamenat, že drtivá většina známé diverzity rodu *Metopus* byla popsána už do poloviny dvacátého století zejména A. Kahlem (1927, 1931, 1932). Vedle již dříve popsaných morfologických druhů byla v posledních několika letech publikovaná, bohužel bez patřičné molekulární charakterizace, řada dalších metopidních nálevníků převážně rodu *Metopus* (Vďačný & Foissner 2017a, b). Nedostatek genetických, natož pak genomických nebo transkriptomických dat, a využívání čistě morfologických deskripcí i v současné době (Vďačný & Foissner 2017a, b) vede ke značné taxonomické inflaci a současně se mívá se smysluplným zkoumáním vzájemných fylogenetických vztahů jak v rámci metopidů skupiny IAC, tak vztahu volně žijících IAC metopidů a klevelandelidů.

Značná část známé diverzity metopidů se tak obecně nese v podobě „tradovaných“ nedostatečně morfologicky popsaných druhů s nejasnými fylogenetickými vztahy. Vzniklou zmatek druhů se pokusil systematizovat už na přelomu dvacátých a třicátých let dvacátého století A. Kahl (1932), a to rozdělením podle základních morfologických kritérií do pěti skupin následně převzatých autory Esteban et al. (1995) se zjednodušenými definicemi (srov. obr. 2):

Skupina 1: *Metopus palaeformis*-like

šířka buňky v prostřední části je stejná nebo menší než v posteriorní části, buňky jsou obvykle štíhlé a protáhlé;

Skupina 2: *Metopus striatus*-like

zvonovitý tvar buňky, širší v anteriorní polovině oproti posteriorní, posteriorní konec zakulacený;

Skupina 3:

buňka je nejširší v prostřední části, posteriorní konec může být rovný i zakulacený;

Skupina 4:

přibližně oválný tvar buňky;

Skupina 5:

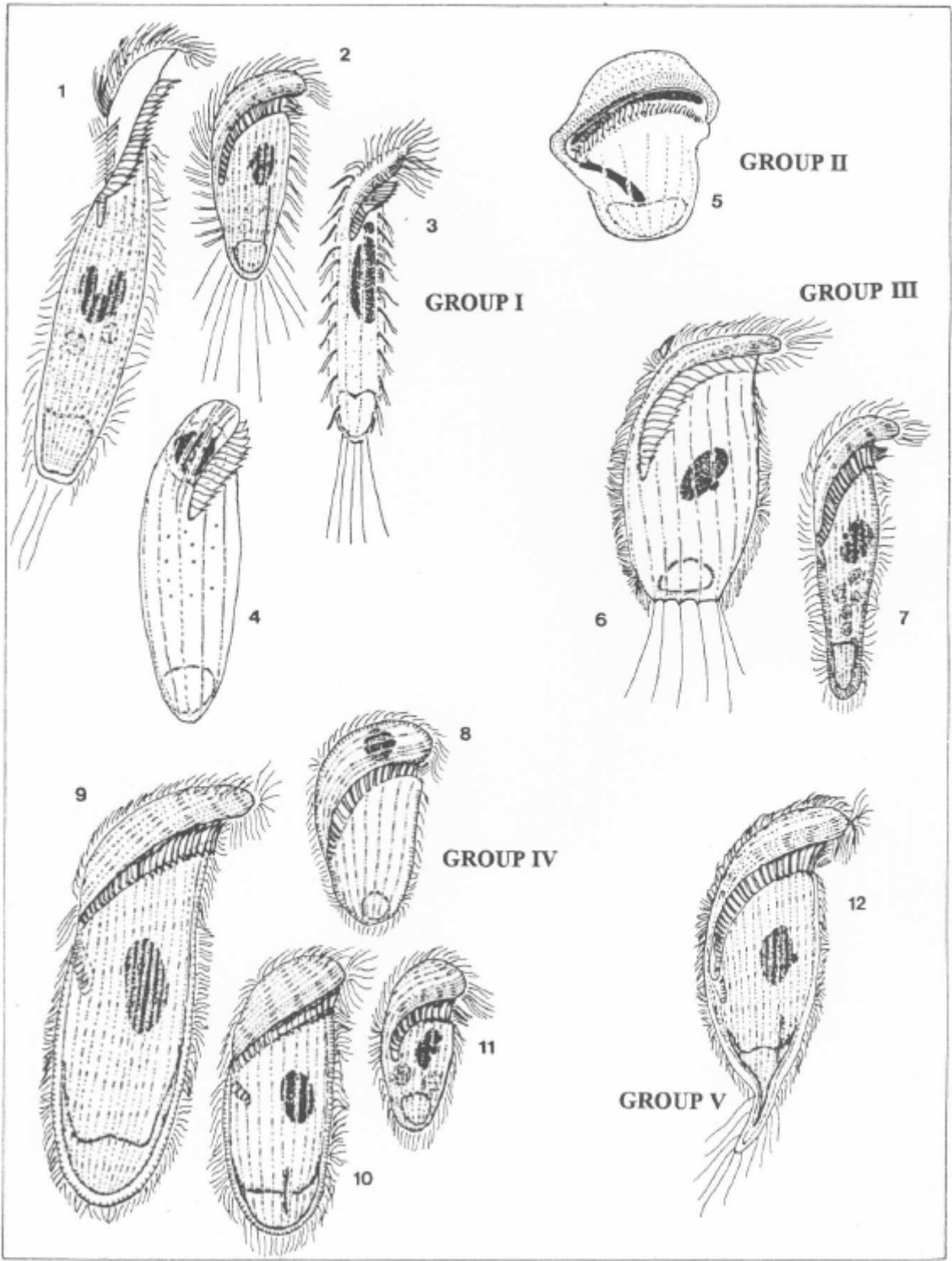
zuzující se posteriorní část buňky na konci zašpičatělá.

Autoři zmíněné systematizace tvrdí, že výrazná morfologická diverzita jednotlivých druhů rodu *Metopus* umožňuje rozlišit příslušné skupiny čistě na základě tvaru buňky (Esteban et al. 1995). Poněkud pikantní zajímavostí pak je, že přes toto sebevědomé prohlášení došlo patrně právě ve studii snažící se o systematizaci rodu *Metopus* k chybné determinaci podle pozorování živých buněk právě v případě typového druhu *M. es.* Ve studii jsou uvedené jen mikrofotografie, takže lze jen spekulovat na základě těch nejobecnějších znaků. Nicméně, prezentovaný organismus se od druhu *Metopus es* liší tvarem anteriorního konce preorálního dómu, který není kupolovitý a je příliš drobný, naopak je tu preorální dóm delší, zčásti obtáčející buňku a končící až na její dorzální straně, což se vůbec neshoduje s obecnou morfologií *M. es.* S poukazem na další znaky pochybují o správné determinaci i Bourland et al. (2017a).

Takto pojatá taxonomie (viz výše) zásadním způsobem poznamenala současnou situaci, zvláště ve skupině IAC. Ta byla ovšem definovaná až později čistě na základě molekulárních dat (Bourland et al. 2018b). Autoři morfologické systematizace tehdy známé zástupce dnes patřící do skupiny IAC řadí do skupin 1 a 2 (Esteban et al. 1995), kdy skupina 1 současně zahrnuje i fylogeneticky značně vzdálené druhy, jako např. *Metopus setosus* a *Heterometopus palaeformis* (v té době ještě zástupce rodu *Metopus*). Přes snahu o synonymizaci řady morfologických druhů a bezesporu žádoucí zjednodušení chaosu rodu *Metopus* se nedá tento postup přijmout jako dostačující.

Skupina IAC je totiž ve vztahu k ostatním skupinám řádu Metopida poněkud zálužná. Najdou se zde zástupci jako *Atopospira*. Od ostatních linií velmi morfologicky odlišný metopid, takže byl už historicky řazen do obou hlavních rodů metopidů, *Metopus* (Kahl 1927, 1932) a *Brachonella* (Jankovskij 1964). U Jankovského (1964) už byl tento metopid v podrodu *Atopospira*, a později byl povýšen na samostatný rod (Bourland & Wendell 2014). Zároveň ale skupina IAC zahrnuje i řadu vzájemně podobných izolátů v literatuře popsanych často jako jeden druh (typicky *Metopus minor* nebo *M. hasei*) (např. Dragesco & Dragesco-Kernéis 1986; Foissner & Agatha 1999; Foissner et al. 2002; Vďačný 2007; Çapar 2007), ačkoli jejich příslušnost ke stejnému druhu je nezdědká diskutabilní i z čistě morfologického hlediska (viz diskuze).

V současné době nejsou známé morfologické znaky, pomocí nichž by se dala skupina IAC definovat, takže bez molekulárních dat neexistuje způsob, jak situaci rozplést. Navzdory tomu jsou stále popisovány nové morfologické druhy rodu *Metopus* například pomocí morfometrických statistických metod bez molekulárních dat (Vďačný & Foissner 2017a). Jde o zřetelnou snahu udržet rozkošatělý rod *Metopus* stále při životě navzdory současným fylogenetickým analýzám, které ho odhalují jako nemonofyletický (Bourland et al. 2020; Li et al. 2020). Protože u takto popsanych druhů neznáme jejich fylogenetickou pozici, nedají se využít pro taxonomické uspořádání skupiny Metopida a jen prodlužují seznam druhů, které bude nutno dříve nebo později revidovat.



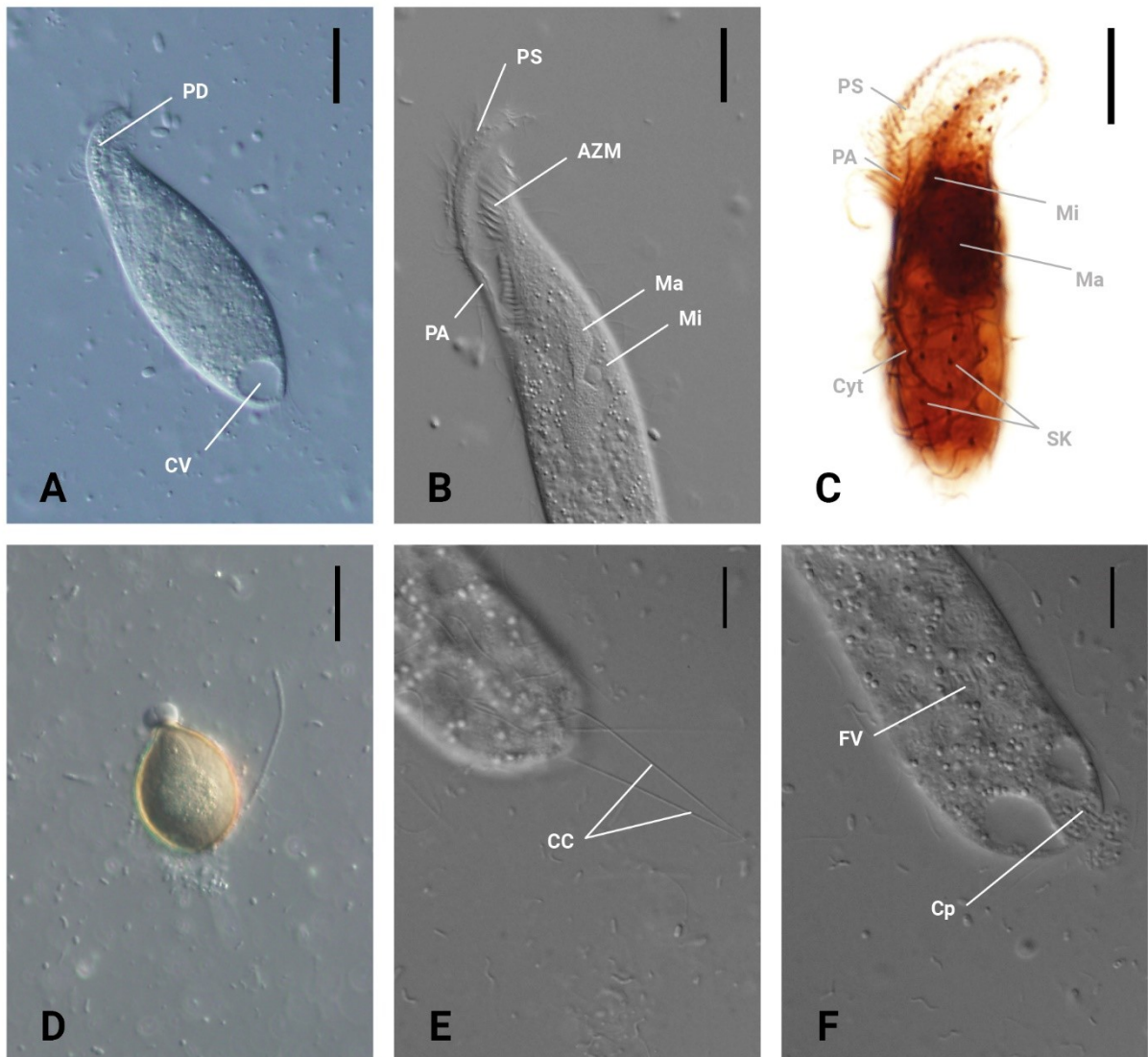
Obr. 2 Skupiny morfotypů druhu *Metopus*, převzato z Esteban et al. (1995).

2.3 Základní morfologie metopidů

Pro buňky nálevníků (Sar: Alveolata: Ciliophora) jsou typické komplexní morfologické struktury, jako cortex nebo membranely. Typologie těchto struktur se potom hojně využívají v taxonomii. To platí i pro třídu Armophorea a potažmo skupinu IAC. Buňky nálevníků pokrývají pásy bičíků nazývané somatické kinety (SK). Obvykle mají buňky cytostom (buněčná ústa), cytofarynx (buněčný hltan tvořený strukturami podkládajícími cytostom) a cytoprokt (buněčnou řiť). Strana buňky, kde je umístěn cytostom, je u metopidů definována jako ventrální. Kolem cytostomu se nachází skupinově specifická orální ciliatura (několika- až mnohabičíkové struktury). V blízkosti cytoproktu je obvykle patrná kontraktilní vakuola sloužící k odstraňování zplodin z organismu. Pro nálevníky je také typický jaderný dualismus, tzn. dva typy jader. Mikronukleus je aktivní během a po dělení buňky, dává následně vzniknout makronukleu, který zajišťuje fyziologické funkce buňky (Lynn 2017). Buněčná membrána je u nálevníků podložena alveoly, nicméně u metopidů a klevelandelidů jsou velmi komprimované nebo až nepřítomné (de Puytorac & Grain 1969; Lynn 2008; Rotterová 2015). Somatické kinety jsou u metopidů a klevelandelidů, a tedy i skupiny IAC, tvořeny dikinetidami (Lynn 2008), tedy dvěma bazálními tělísky, ne však nutně nesoucími bičík (Foissner & Agatha 1999). Na posteriorním konci buňky mohou být přítomná kaudální cilia (někdy dlouhé, často rigidní bičíky) (Lynn 2017). Orální ciliatura je tvořena dvěma strukturami: zónou adorálních membranel (ty jsou tvořeny dvěma nebo třemi řadami bičíků, resp. bazálních tělísek) a parorální membránou (jedno- nebo dvouřadou) (Lynn 2008). Perizonální pruh se nachází vpravo od cytostomu (Lynn 2008). U metopidů tvoří pás podél hrany preorálního dómu pět kinet (Foissner & Agatha 1999). Preorální dóm je přední část buňky před cytostomem (Bourland et al. 2017b); pro metopidy je typicky zahnutý doleva a u metopidů skupiny IAC je typicky výrazně spiralizován (např. Foissner & Agatha 1999; Omar et al. 2017; Bourland et al. 2018b). Co se týče jaderného aparátu (NA), najdeme u skupiny IAC u živých buněk vždy jeden mikronukleus a jeden makronukleus obvykle v těsném kontaktu (např. Foissner & Agatha 1999; Omar et al. 2017; Bourland et al. 2018b). Typické morfologické struktury metopidů viz obrázek 3.

Typické a taxonomicky využívané morfologické a morfometrické znaky jsou:

- počet somatických kinet
- délka parorální membrány
- počet adorálních membranel, resp. délka zóny adorálních membranel
- počet kinet v perizonálním pruhu
- počet falešných kinet v perizonálním pruhu



Obr. 3 Morfologické struktury metopidů. A – Izolát GRIDI MO4 (DIC), B – LERMA 4 (DIC), C – SEMATRY (protargol), D – Typická lahvovitá cysta (SEMATRY), E – 4PIRAN (DIC), F – 4PIRAN (DIC). CV = kontraktilní vakuola, PD = preorální dóm, AZM = zóna adoralních membranel, PA = paroralní membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, Cyt – cytofarynx, SK = somatické kinety, CC = kaudální cilia, Cp = Cytoprokt, FV = potravní vakuola. Škály: 20 μ m (A, B, D, E), 10 μ m (C, F). Vlastní mikrofotografie.

2.4 Aktuální taxonomie a fylogenetika skupiny IAC

Skupina IAC je vnitřní linií čeledi Metopidae z řádu Metopida. Aktuální stav poznání fylogenetických vztahů celého řádu Metopida zahrnujícího čeledi Tropidoattractidae, Apometopidae a Metopidae (a jako svou vnitřní větev i řád Clevelandellida), lze nahlédnout na obrázku 4. Skupina IAC byla definována jako klád s robustní podporou, který zahrnuje endosymbiotický řád Clevelandellida a jemu nejvíce příbuzné linie řádu Metopida (Bourland et al. 2018b). Vzhledem k tomu, že Bourland et al. (2018b) počítali s tím, že tento klád vyžaduje zásadní taxonomickou revizi, nese prozatím jen kódové pojmenování IAC (je to zkratka z názvů některých obsažených taxonů – rodů *Idiometopus* a *Atopospira* a řádu Clevelandellida). Mimořádná zajímavost skupiny IAC spočívá v tom, že v rámci této nevelké skupiny patrně došlo ke vzniku endosymbiotického způsobu života hned dvakrát nezávisle.

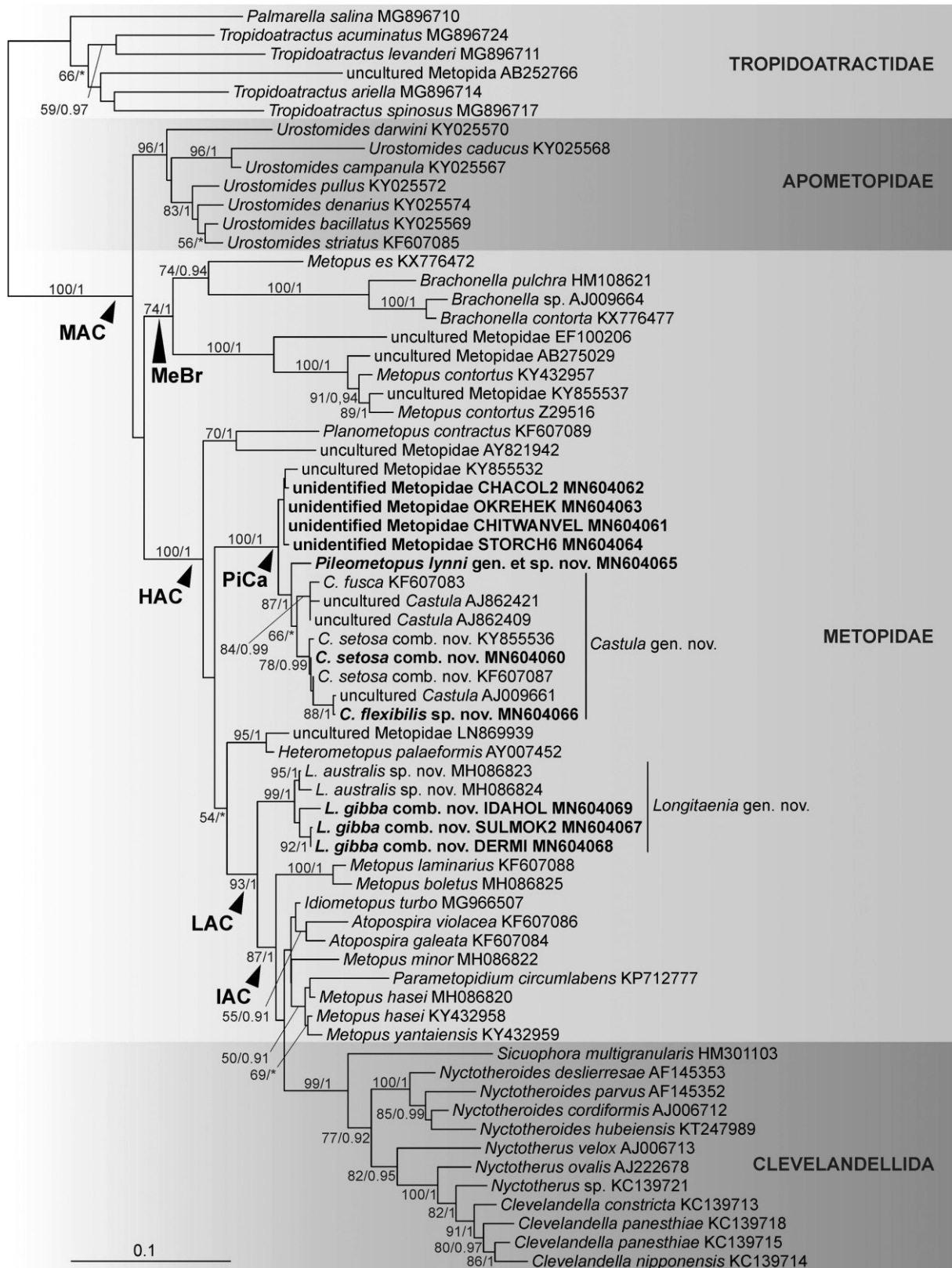
První endosymbiotickou skupinou v rámci IAC je početný a diverzifikovaný řád Clevelandellida zahrnující několik rodů se známými molekulárními daty – *Sicuophora*, *Nyctotheroides*, *Nyctotherus*, *Clevelandella* a *Paraclevelandia*. Dále pak celou řadu dalších, morfologicky popsaných rodů patřících do čeledí Inferostomatidae Ky, 1971, Nyctotheridae Amaro, 1972, Neonyctotheridae Affa'a, 1987 a Sicuophoridae Amaro, 1972, které všechny čekají na zásadní revizi (Lynn 2008). Clevelandellidi osidlují širokou škálu hostitelů, mezi které patří zejména švábi (Blattodea) (např. Kidder 1937; Albaret 1975; Lynn & Wright 2013; Pecina & Vďačný 2020) a žáby (Anura) (např. Albaret 1975; Affa'a 1991, 1995; Fokam et al. 2013; Li et al. 2016), ale také mnohonožky (Diplopoda) (Albaret 1970; Van Hoek et al. 1998), listonozi (Notostraca) (Entz 1888), měkkýši (Lynn 2008), žížaly čeledi Megascolecidae (Fokam et al. 2014), ryby (Daday 1905; Norman Grim 1992, 1998; Norman Grim et al. 1996), želvy (Geiman & Wichteremann 1937) a plazi (Hegner 1940; Amrein 1952). Vedle clevelandellidů zahrnuje ovšem skupina IAC ještě druhou endosymbiotickou linii čítající v současnosti jediného zástupce s dostupnými molekulárními daty, *Parametopidium circumlabens* ze střeva ježovek (Echinoidea) (Biggar & Wenrich, 1932; Lucas 1934; Aesch 2001; Silva-Neto et al. 2016). Do rodu *Parametopidium* by pravděpodobně mohl patřit ještě jeden morfologicky popsaný druh, *Metopus rotundus* Lucas, 1934 (Lucas 1934), také z ježovek.

Volně žijících metopidů ze skupiny IAC, kteří jsou předmětem této práce, je standardním způsobem včetně molekulárních dat popsáno jen sedm druhů. Jejich přehled s nutným vysvětlujícím komentářem uvádím níže. Jak vyplývá z popisů, navzdory tak malému počtu vykazují na nálevníky značnou mezidruhovou morfologickou diverzitu (Bourland & Wendell 2014; Bourland et al. 2018b; Omar et al. 2017; Vďačný & Foissner 2019). Důvod pro malý počet druhů použitelných pro fylogenetickou analýzu spočívá v tom, že donedávna nebylo běžné využívat pro taxonomii metopidních nálevníků molekulární metody a autoři se i v nedávné době spoléhali ať už

z nedostupnosti, nebo z jiného důvodu výhradně na morfologická data (Foissner & Agatha 1999; Çapar 2007; Vďačný 2007; Vďačný & Foissner 2017a, b). Pro delimitaci druhů autoři například využili statistické metody aplikované na morfologická a morfometrická data (Vďačný & Foissner 2017a).

To všechno představuje pro molekulárně definovanou skupinu IAC problém a některé publikované morfologické druhy tak v seznamu zmíníme jako kandidátní, čili pravděpodobně patřící do skupiny IAC na základě jejich morfologie. Situace ve skupině IAC je tedy podobně neutěšená a chaotická jako byla ještě nedávno v celé skupině Armophorea, jak ostatně píše Rotterová ve své diplomové práci (Rotterová 2015). Za několik posledních let díky soustředěnému úsilí došlo ke značnému projasnění a uspořádání skupiny Metopida díky důkladným popisům čeledí Tropidoattractidae a Apometopidae a redeskripci řady podstatných rodů a druhů (Rotterová et al. 2017; Bourland & Wendell 2014; Bourland et al. 2017a, b, 2018a, b, 2020).

Na závěr zdůrazním, že na základě známých analýz založených na genu pro 18S rRNA je zjevné, že skupina Metopida je silně parafyletická vůči klevelandelidům (Vďačný et al. 2019; Bourland et al. 2018b, 2020). A původně velmi početný, morfologicky definovaný rod *Metopus* se ukazuje jako nemonofyletický (Vďačný et al. 2019; Bourland et al. 2018b, 2020; Li et al. 2020).



Obr. 4 Fylogenetický strom řádů Metopida (se třemi čeledi Metopidae, Tropidoatractidae, Apomatopidae) a Clevelandellida. Jsou vyznačeny i neformálně pojmenované klády včetně IAC. Čísla u větví znamenají statistickou podporu vyjádřenou bootstrapy a posteriorními pravděpodobnostmi. Převzato z Bourland et al. 2020.

2.5 Seznam volně žijících zástupců skupiny IAC publikovaných s molekulárními daty

Metopus hasei (Sondheim, 1929) Foissner & Agatha 1999*

* Publikovaný popis je čistě morfologický, sekvence byla dodána později, a není podložena žádnou další dokumentací (Vďačný et al. 2019). Vzhledem k tomu, že se na citované studii podílel i W. Foissner, důvodně předpokládám, že identifikace druhu proběhla podle jeho popisu ve Foissner & Agatha (1999).

Metopus hasei (Sondheim, 1929) sensu Omar et al. 2017*

* Publikovaná sekvence doprovázená pouze jedinou DIC mikrofotografií.

Metopus laminarius Kahl, 1927*

* Publikované jsou dvě sekvence od autorů Vďačný et al. 2019 (bez dalších dat) a Bourland et al. 2014 (doprovázená jednou mikrofotografií).

Metopus boletus Vďačný & Foissner 2019

Metopus minor (Kahl, 1932) Foissner et al. 2002*

* Publikovaný popis je čistě morfologický, sekvence byla dodána později a není podložena žádnou další dokumentací (Vďačný et al. 2019). Vzhledem k tomu, že se na citované studii podílel i W. Foissner, důvodně předpokládám, že identifikace druhu proběhla podle jeho popisu ve Foissner et al. (2002).

Metopus yantaiensis Omar et al. 2017

Atopospira galeata (Kahl, 1927) Bourland & Wendell 2014

Atopospira galeata (Kahl, 1927) sensu Vďačný et al. 2019*

* Sekvence není podložena žádnou další dokumentací (Vďačný et al. (2019).

Atopospira violacea (Kahl, 1926) Bourland & Wendell 2014

Idiometopus turbo (Dragesco & Dragesco-Kernéis, 1986) Bourland et al. 2018b

2.6 Ekologie metopidů ze skupiny IAC

Nálezy metopidů skupiny IAC jsou výhradně z anaerobního nebo mikroaerobního prostředí (např. Esteban et al. 1995; Foissner 1981; Foissner & Agatha 1999; Bourland et al. 2017a). Metopidi jsou podle všeho obligátní anaerobové vzhledem k přítomnosti hydrogenozomů a endosymbiotických metanogenů (Fenchel & Finely 2010; Beinart et al. 2018). Někteří autoři spekulují o možnosti krátkodobé aerotolerance u *Metopus yantaiensis* vzhledem k tomu, že kultura přežila několik dní v odkryté Petriho misce (Omar et al. 2017). Kulturu se jim nicméně nepodařilo stabilizovat a trvale udržet (Omar et al. 2017). Pouze krátkodobou toleranci ke kyslíku v médiu uvádějí i další studie (Narayanan 2011; Fenchel 2014; Priya et al. 2019).

Doložená prostředí výskytu metopidních nálevníků zahrnují zejména sulfidický sediment eutrofních sladkovodních těles, půdu bohatou na dusík, rozkládající se rostlinou organickou hmotu na půdním podkladu včetně lesní, mořský sediment a rozkládající se organickou hmotu, rašeliniště, sediment slaných jezer, sediment ústí řek, půdu v záplavových perimetrech toků (např. Esteban et al. 1995; Foissner 1981; Foissner & Agatha 1999; Kreutz & Foissner 2006; Bourland et al. 2017a). Což je podobně pestré složení lokalit jako samotná diverzita metopidů. Z hlediska trofie jde zřejmě zejména o eutrofní prostředí, ať už jde o vodní tělesa (Bourland & Wendell 2014), nebo o půdu (Foissner 1999). Z hlediska salinity pochází většina známé diverzity skupiny IAC ze sladkovodních stanovišť. Jsou však zaznamenány i nálezy ze slaného nebo i hypersalinního prostředí (Esteban & Finely 2003, 2004; Rotterová 2015). Z hlediska habitatu jsou zajímavé i environmentální sekvence (provedenou fylogenetickou analýzou zařazené do skupiny IAC, viz níže) získané ze spodní vody bývalého uranového a kobaltového dolu v záplavové oblasti řeky Colorado v USA (Holmes et al. 2013). Studie provedené na družích *Metopus es* (Bourland et al. 2017a) a *M. hasei* (Foissner & Agatha 1999; Foissner et al. 2002; Foissner 2016) hovoří spíše pro to, že jak rozšíření metopidů obecně, tak zástupců skupiny IAC, je kosmopolitní (více viz diskuze).

Pro ekologii metopidů ze skupiny IAC (a vlastně i metopidů obecně) jsou podstatným životním stádiem trvalé cysty. Vzhledem k efemérnosti prostředí, v němž se vyskytují zejména půdní druhy (Foissner 1981, 1999; Foissner & Agatha 1999; Omar et al. 2017) a druhy z periodicky zaplavovaných oblastí (Vďačný & Foissner 2017a, b, 2019), jsou k vysychání odolné cysty nezbytným předpokladem pro přežití. Lynn (2008) dokonce spekuluje, že metopidi mohou v podobě cyst přetrvávat většinu svého života. Cysty metopidů skupiny IAC mají typický lahvovitý tvar s operkulem (Esteban et al. 1995), zatímco v případě klevelandelidů, resp. druhu *Nyctotherus ovalis*, je tvar elipsoidní (Lucas 1928).

3 Materiály a metody

3.1 Vzorky a kultury

3.1.1 Vzorky, kultivace a média

Kultury i nekultivovatelné metopidy byly získány z řady vzorků z rozličných habitatů. Zaměřil jsem se zejména na typická sladkovodní i mořská prostředí: anoxické sedimenty vodních těles, pravidelně zaplavované oblasti, břehy rybníků a řek, půdní vzorky z lesů nebo polí atp.

Zhruba jeden až dva mililitry tekutého vzorku nebo odpovídající množství půdního vzorku byly umístěny do zhruba 10 ml média v 15ml plastové zkumavce. Pro sladkovodní vzorky bylo použito Sonnebornovo médium pro *Paramecium* (ATCC medium 802), případně 3% LB médium (ATCC medium 1065). Pro mořské a brakické vzorky bylo použito mořské Sonnenbornovo médium (ATCC medium 1525), respektive ATCC 802 a ATCC 1525 v poměru 1:1 či jiném příznivém poměru. Všechna média byla připravena podle příslušných protokolů dostupných na webových stránkách ATCC (<https://www.atcc.org/>).

Každé dva až tři týdny podle příslušné kultury pak byly plastovou Pasteurovou pipetou přeneseny asi 1–2 ml kultury do čerstvého média, často včetně sedimentu na dně zkumavky. Pro citlivé kultury bylo třeba nejprve několik dní předem „předočkovat“ čerstvé médium bakteriemi z kultury a poté teprve přenést celou kulturu. Kultivace probíhala v pokojové teplotě za snížené nebo úplné nepřítomnosti světla v polyxenických agnotobiotických podmínkách (za přítomnosti neidentifikovaných prokaryot, protist, případně drobných metazoi).

V případě většího množství polosuchého materiálu byla vyzkoušena i metoda „non-flooded Petri dish“ popsanou ve Foissner (1987). Petriho miska se naplní detritem, mechem nebo jiným polosuchým nebo suchým materiálem a následně se zalije destilovanou vodou jen tak, aby hladina nepřesahovala pevný materiál v misce, ale pouze ho smočila. Následně se miska uzavře a prohlídí s odstupem několika dnů. Foissner doporučuje odstup 4, 6, 10, 14 a 20 dnů. Je možné přidat sušený sterilizovaný rostlinný materiál (Omar et al. 2017). Jako modifikace lze použít zalití přímo cerofylovým médiem. Takto získané populace byly přeočkovány do 15ml zkumavky s médiem, jak je popsáno výše.

3.1.2 Příprava umělého anoxického prostředí

K dosažení umělého anaerobního prostředí byly využity nádoby AnaeroJar 2,5 l (Oxoid) a sáčky AnaeroGen (Oxoid). Zkumavky s kulturami, bakteriálně „předočkovanými“ médii nebo čerstvými médii byly umístěny do nádoby společně se sáčkem a uzavřeny po dobu nejméně jednoho týdne.

3.2 Světelná mikroskopie

3.2.1 Přípravy a pozorování živých buněk

Živé buňky z kultur byly pozorovány pomocí světelného mikroskopu Olympus BX51 (Olympus Corporation) vybaveného DIC (diferenciálním interferenčním kontrastem). Snímky byly pořízeny kamerou Olympus DP70 (Olympus Corporation). Živé buňky byly pozorovány v přirozeném pohybu i při omezeném pohybu. K omezení pohybu bylo využito buď snížené množství média pod krycím sklem, nebo „plastelínová“ metoda (viz níže). Buňky k pozorování byly připraveny buď nanesením preparátu přímo z kultury pomocí plastové Pasteurovy pipety, nebo byly jednotlivé buňky vybrány z kultury či vzorku skleněnou mikropipetou a přeneseny do kapky čerstvého média, filtrovaného vzorku nebo destilované vody. K vybírání buněk byl využit invertovaný mikroskop Motic AE 2000 (Motic).

„Plastelínová“ metoda“

Drobná kapka s preparátem je umístěna na podložní sklo. Krycí sklo je opatřeno na spodní straně v rozích drobnými kousky plastelíny. Díky plastelíně je potom možné modifikovat prostor mezi krycím a podložním sklem tak, aby byl co nejvíce omezen pohyb buňky (podle D. Méndez-Sánchez, osobní komunikace). Metoda je efektivní zejména pro větší druhy nálevníků.

3.2.2 Barvení protargolem

Barvení protargolem probíhalo podle standardního protokolu (Foissner 2014) a jeho modifikace (Bourland & Wendell 2014), který byl dále mírně upraven. Vlastní použité modifikace:

1. Místo 4% formalínu byl pro fixaci buněk použit alternativně také Bouinův roztok. Ten byl připraven smícháním 75 ml nasyceného vodného roztoku kyseliny pikrové a 25 ml 100% formalínu (tj. 40% formaldehydu). Do roztoku bylo nakonec přidáno 5 ml „ledové“ kyseliny octové.

2. Ve všech krocích předcházejících použití vývojky byla kohoutková voda nahrazena destilovanou vodou.

3.2.3 Barvení uhličitanem stříbrným

Barvení uhličitanem stříbrným (Ag_2CO_3) probíhalo podle standardního protokolu (Fernández-Galiano 1976) a jeho modifikace (Foissner 2014) s následujícími vlastními úpravami:

1. Barvení bylo prováděno ve skleněné misce („embryo dish“).
2. Byla použita kapka kultury nebo čistého média s vybranými buňkami omytými v kapce destilované vody. Následně byl preparát fixován kapkou 4% formalínu.
3. Vzhledem k menšímu objemu vzorku bylo využito poměrově menší množství chemikálií: 75 μl pyridinu, 750 μl Rio-Hortegova roztoku, 200 μl peptonové proteázy a 1 ml destilované vody.
4. Pro zastavení reakce byly jednotlivé buňky přímo přeneseny do kapky 4% vodného roztoku thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

3.3 SEM (skenovací elektronová mikroskopie)

Při přípravě preparátů pro pořizování SEM snímků bylo postupováno podle standardního protokolu (Foissner 2014). Preparáty byly pozorovány pomocí skenovacího mikroskopu JEOL JSM-6380 (JEOL).

3.4 Molekulární metody

Izolace DNA proběhla z kultur nebo jednotlivých buněk. Následně byl amplifikován gen pro 18S rRNA s použitím obecně eukaryotických nebo specifických primerů. Amplifikované DNA fragmenty byly purifikovány a následně sekvenovány.

3.4.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna dvěma způsoby.

Izolace z kultur

Asi 1,5 ml vzorku bylo odstředěno po dobu 8 minut při 500 g. Následně bylo odstraněno 1400 µl supernatantu a zbývajících 100 µl bylo resuspendováno a použito k izolaci DNA. Celková DNA byla izolována z kultur pomocí soupravy pro izolaci DNA (Genomic DNA Minikit, Geneaid; DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen; nebo ZR Genomic DNA Kit II TM, Zymo Research) podle pokynů výrobce. Izolovaná DNA byla skladována při -20 °C.

Izolace z jednotlivých buněk

Jednotlivé buňky byly za pomoci invertovaného mikroskopu odchyceny a přeneseny tenkou skleněnou pipetou do kapky čistého média nebo destilované vody. Následně byly omyty přenosem do dalších kapek s čistým médiem nebo destilovanou vodou. Očištěné buňky byly stejným způsobem přeneseny do zkumavky o objemu 1,5 ml, do přibližně 30 µl DNA/RNA shieldu (Zymo Research). Celková DNA byla izolována z kultur pomocí soupravy pro izolaci DNA (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Qiagen) podle pokynů výrobce. Izolovaná DNA byla skladována při -20 °C.

Příprava buněk pro „direct PCR“

Pro amplifikaci bez předchozí izolace DNA byl použit postup pracovně nazvaný jako „direct PCR“. Postup je stejný jako u izolace DNA z jednotlivých buněk s tím rozdílem, že jsou po omytí buňky (u nálevníků 1–5 buněk) rovnou přenášeny do PCR zkumavky s připravenými chemikáliemi.

3.4.2 Amplifikace DNA, elektroforéza a purifikace amplifikovaných produktů

Pro amplifikaci genu pro 18S rRNA byly využity následující primery (viz tab. 1).

Tab. 1 Použité amplifikační PCR primery.

Euk A	5' AYCTGGTTGAYYTGCCAG 3'
Euk B	5' TGATCCATCTGCAGGTTACCT 3'
ArmF1	5' GCGAYATRTCATTCAAGT 3'
ArmR4	5' GWGGTTWTCCACACAGTC 3'

Obecné eukaryotické primery Euk A a primery Euk B (Medlin et al. 1988) byly využity zejména při amplifikaci DNA z jednotlivých buněk. Specifické primery pro Armophorea ArmF1 a ArmR4 (Bourland et al. 2017a) byly využity při amplifikaci DNA získané z kultur, ve kterých mohly být i jiné eukaryotické organismy. Reakční mix byl připraven z 25 µl PPP Master mixu (Top-Bio), 20 µl dH₂O, 1,25 µl každého

ze dvou primerů o koncentraci 3,2 pmol a 2,5 µl izolované DNA (resp. vybrané buňky ve stejném objemu dH₂O u „direct PCR“). Teplota pro annealing byla 55 °C. Úspěšnost PCR amplifikace byla ověřena pomocí horizontální gelové elektroforézy. Amplifikované DNA fragmenty byly purifikovány kitem Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid), resp. ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fischer) podle pokynů výrobce. Purifikovaná DNA byla skladována při -20°C. Pro sekvenaci byl použit následující mix: 100 ng DNA, 3,2 pmol primeru a 8 µl dH₂O. Byly použity sekvenační primery viz tab. 2 (Elwood et al. 1985). Sangerovo DNA sekvenování bylo provedeno v Laboratoři sekvenace DNA Univerzity Karlovy vybavené sekvenátorem ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

Tab. 2 Použité sekvenační primery.

1055F	5' GGTGGTGCATGGCCG 3'
1055R	5' CGGCCATGCACCACC 3'
577F	5' GCCAGCMGCCGCGGT 3'
577R	5' ACCGCGGCKGCTGGC 3'

3.5 Analýza sekvencí

3.5.1 Editace sekvencí, dataset a příprava alignmentu

Pro předběžnou determinaci získaných DNA částečných sekvencí genu 18S rRNA byla využita online služba BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) v modu blastn, který využívá jako zdrojovou databázi sekvence publikované v databázi GenBank. Částečné sekvence každého izolátu byly složeny do jedné výsledné sekvence pomocí programu Seqman (Lasergene). Sekvence primerů byly odstraněny. Z takto připravených sekvencí byl vytvořen dataset a doplněn vybranými sekvencemi z databáze GenBank. Pro tvorbu alignmentu byl využit program MAFFT 7 v rámci online služby (<https://mafft.cbrc.jp>) využívající metodu MAFFT (Katoh et al. 2002) s defaultně nastaveným algoritmem G-INS-i. Alignment byl manuálně editován v programu MEGA 10.1.6 (Kumar et al. 1994). Výsledný editovaný alignment sestával z 1680 pozic.

Do datasetu bylo zahrnuto 96 sekvencí, z toho 37 bylo z mých izolátů a 59 z databáze Genbank. Byly použity všechny publikované sekvence pro skupinu IAC, s výjimkou tří, které byly vyřazeny jako duplicitní (šlo o klony téhož izolátu). Další databázové sekvence obsahovaly reprezentativní přehled čeledi Metopidae a Apometopidae a jako outgroup byly použity dvě sekvence z čeledi Tropidoattractidae.

3.5.2 Fylogenetická analýza genu pro 18S rRNA

Fylogenetický strom byl konstruován metodou maximum likelihood (ML) na portálu CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2>; (Miller et al. 2010) nástrojem RAxML-HPC2 Workflow on XSEDE (Stamatakis 2006). Byl využit model GTRGAMMAI, který byl před tím v programu MEGA 10.1.6 vybrán jako nejvhodnější pro daný alignment. Statistická podpora byla provedena metodou bootstrap (BS) s 1000 opakováními.

Bayesovská analýza byla provedena v programu MrBayes 3.2.2. (Ronquist et al. 2012) s modelem GTR + G + I. Byly spuštěny čtyři MCMC řetězce pro 60 000 000 generací se vzorkovací frekvencí 1 000 generací, dokud průměrná standardní odchylka na základě posledních 75 % generací nebyla nižší než 0,01. Prvních 25 % stromů bylo odstraněno (burn-in).

4 Výsledky

4.1 Vzorky a kultivace

Podařilo se získat více než 30 izolátů metopidů ze skupiny IAC a celou řadu metopidů z jiných skupin, které nejsou do této práce zahrnuty. Použité izoláty ze skupiny IAC a další vybrané v tabulce 3 níže. Většina získaných vzorků byla uložena do depozitu při pokojové teplotě pro možné další použití. Krom standardního sběru vzorků jsem zkoušel využívat i starší vzorky anoxických sedimentů uložené v depozitu i několik let. Archivace vzorků se ukázala jako velmi důležitá. Řadu izolátů (ANNZ8, ANNZ9Q, IRAN2C, VELKAL XXA, KRUMLI), jejichž kultury z různých důvodů nepřežily, se podařilo „vzkřísit“ právě z původních vzorků, ačkoli již téměř vyschlých. Potvrdila se tak Foissnerova metoda využití na vzduchu sušených vzorků (Foissner 1987). Navíc se podařilo zjistit, že cysty metopidů vydrží aktivní v polovyschlých nebo i téměř vyschlých vzorcích nejméně po několik let. Zatímco izoláty ANNZ8 a ANNZ9Q byly oživeny po roce a znovu po dvou letech, izolát IRAN2C byl oživen po více než třech letech. V případě ANNZ8 a ANNZ9Q byl navíc vzorek původně odložen jako planý a metopidy se v něm podařilo objevit až po roce archivace. Pokud uvádím, že byla kultura obnovena z původního vzorku, bylo vždy verifikováno novou sekvenací, zda jde o téhož metopida. Celkem bylo do analýzy zahrnuto 32 vlastních izolátů ze skupiny IAC a 8 vlastních izolátů z jiných skupin čeledi Metopidae.

Tab. 3 Seznam izolátů skupiny IAC a linie S

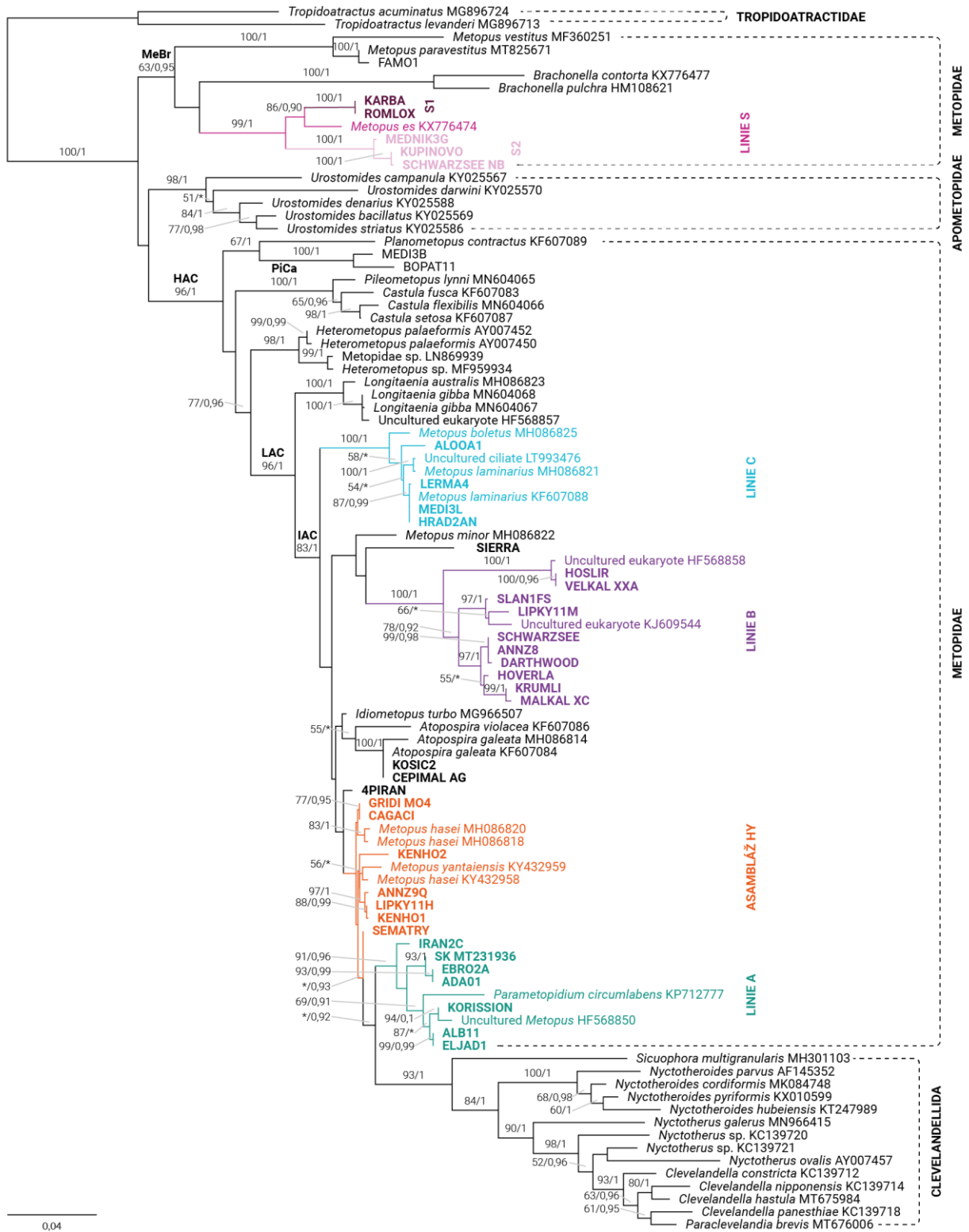
IZOLÁT	KLÁD	LOKALITA	KOORDINÁTY	TYP VZORKU
4PIRAN	IAC	Írán	–	sediment vulkanického jezera
ADA01	IAC	Konya, Meke Göllü, Turecko	37° 41' 21,5 " N 33°38' 12,0 "E	–
ALB11	IAC	Orbetello, Itálie	42°25'48.6"N 11°15'07.7"E	mořský plážový sediment
ALOOA1	IAC	Alooa, Nias, Indonésie	22°35'07"N 63°39'51"E	půda z bažiny v deštném pralese
ANNZ8	IAC	Račí potok, Annín, Česká republika	49°10'29.0"N 13°31'13.9"E	potoční půdní sediment
ANNZ9Q	IAC	Račí potok, Annín, Česká republika	49°10'29.0"N 13°31'13.9"E	potoční půdní sediment
CAGACI	IAC	–	–	–
CEPIMAL AG	IAC	Žinkovy, Česká republika	49°28'09.0"N 13°29'08.9"E	sediment z eutrofního rybníčku
SIERRA	IAC	Žinkovy, Česká republika	49°28'09.0"N 13°29'08.9"E	sediment z eutrofního rybníčku
DARTHWOOD	IAC	Kunratický les, Praha, Česká republika	50°01'15.7"N 14°28'46.4"E	půda s tlejícím listím u rybníčku
EBRO2A	IAC	Ebro, Španělsko	–	sediment z delty řeky Ebro

ELJAD1	IAC	Maroko	32°59'03.9"N 8°44'51.9"W	slanisko v mořské laguně
GRIDI MO4	IAC	–	–	–
HOSLIR	IAC	Hostivice, Česká republika	50°04'20.1"N 14°14'50.6"E	půda z břehu Litovického rybníku
HOVERLA	IAC	Ukrajina	48°05'24.3"N 24°27'23.4"E	bahno z potoka v lese
HRAD2AN	IAC	vrch Hradiště u Chomutova, Česká republika	50°27'N 13°20'E	sladkovodní sediment
IRAN2C	IAC	Írán	–	sediment vulkanického jezera
KENHO1	IAC	Watalii, Rift Valley, Keňa	0°49'34.5"S 36°20'16.6"E	půdní sediment jezera Naivasha
KENHO2	IAC	Watalii, Rift Valley, Keňa	0°49'34.5"S 36°20'16.6"E	půdní sediment jezera Naivasha
KORISSION	IAC	Korfu, Řecko	39°27'10"N 19°52'35"E	sediment z jezera Korission u moře
KOSIC2	IAC	Košice, Slovensko	48°43'23.6"N 21°15'43.7"E	voda z jezírka v městském parku
KRUMLI	IAC	Český Krumlov, Česká republika	48°49'42.0"N 14°19'14.8"E	tlející sediment z rybníčku
LERMA4	IAC	Lerma, Mexiko	19°20'37" N, 99°30'09" W	sediment z mokřadu
LIPKY11H	IAC	Žinkovy, Česká republika	49°28'31.6"N 13°29'23.3"E	sediment z jezírka u pole
LIPKY11M	IAC	Žinkovy, Česká republika	49°28'31.6"N 13°29'23.3"E	sediment z jezírka u pole
MALKAL XC	IAC	Hostivice, Česká republika	50°04'18.7"N 14°15'06.8"E	sediment z rybníku Kala
MEDI3L	IAC	Medník, Česká republika	49°52'06.2"N 14°26'34.9"E	sediment z rybníku
SEMATRY	IAC	Radlický hřbitov, Praha, Česká republika	50°03'14.0"N 14°23'45.3"E	tlející listí ze hřbitova
SCHWARZSEE	IAC	Rakousko	46°40' N 7°16' E	–
SK	IAC	Sal, Kapverdy	16°35'23"N 22°55'29"W	sediment ze slané kaluže
SLAN1FS	IAC	Netřebská slaniska, Česká republika	50°15'40.0"N 14°26'00.2"E	půda ze slaniska u pole
VELKAL XXA	IAC	Hostivice, Česká republika	50°04'18.7"N 14°15'06.8"E	sediment z rybníka Kala
KARBA	MAC	–	–	–
KUPINOVO	MAC	Kupinovo, Srbsko	–	–
MEDNIK3G	MAC	Medník, Česká republika	49°52'06.2"N 14°26'34.9"E	sediment z rybníku
ROMLOX	MAC	Řím, Itálie	41°53'26.0"N 12°28'34.9"E	sediment řeky Tibery
SCHWARZSEE NB	MAC	Rakousko	46°40' N 7°16' E	–

4.2 Fylogenetická analýza skupiny IAC na základě genu pro 18S rRNA

Fylogenetická analýza založená na genu pro 18S rRNA odhalila bohatou a dosud neznámou diverzitu v rámci skupiny IAC (obr. 5). Je nutné opět zdůraznit, že pomocí jednogenné analýzy lze zcela oprávněně diverzitu konstatovat, ale nelze již rozřešit vzájemné vztahy mezi taxony uvnitř skupiny IAC. Současný stav poznání molekulární diverzity metopidů mi bohužel neumožnil použít i další markery, neboť u drtivé většiny druhů je zatím známá pouze (často nekompletní) sekvence genu pro 18S rRNA.

Analýza potvrdila existenci skupiny IAC s robustní podporou 83 (BS), resp. 1 (BPP). Současně potvrdila i pozici klevelandelidů uvnitř skupiny IAC, nicméně na rozřešení její konkrétní pozice vůči ostatním liniím skupiny IAC nestačí. Tabulka nekorigovaných p-distancí sekvencí skupiny IAC v příloze (viz příloha 1).



Obr. 5 Nezakořeněný fylogenetický strom čeledí Metopidae, Apometopidae a řádu Clevelandellida vytvořený metodou maximum likelihood (ML) na portálu CIPRES nástrojem RAxML-HPC2 Workflow on XSEDE na základě genu pro 18S rRNA. Hodnoty na větvích před lomítkem představují statistickou podporu hodnot bootstrapů (BS, RAxML-HPC2 Workflow on XSEDE), za lomítkem pak hodnoty Bayesovy posteriorní pravděpodobnosti (BPP, MrBayes). Bootstrapsy pod hodnotou 50 a posteriorní pravděpodobnosti pod 0,90 nejsou zobrazeny, resp. jsou označeny asteriskem (*). Nově identifikované linie jsou označeny barevně. Nové sekvence ve skupině IAC a linii S jsou tučně.

4.3 Identifikovaná diverzita a podpořené linie

Analýza s vysokou mírou statistické podpory prokázala v rámci skupiny IAC existenci tří výrazných linií obsahujících víc než jeden izolát. Jako nejpříbuznější klevelandelidům vyšla linie A, která zahrnuje izoláty IRAN2C, SK, EBOR2A, ADAO1, ELJAD1, ALB11 a KORISSION společně s druhem *Parametopidium circumlabens* a environmentální sekvencí HF568850. Linie B tvoří izoláty HOSLIR, VELKAL XXA, SLAN1FS, LIPKY11M, HOVERLA, KRUMLI, MALKAL XC, SCHWARZSEE, ANNZ8 a DARTHWOOD společně se dvěma environmentálními sekvencemi, HF568858 a KJ609544. Tato linie neobsahuje žádnou sekvenci známého druhu. Linie C obsahuje izoláty ALOOA1, LERMA4, MEDI3L a HRAD2AN a tři sekvence známých druhů, *Metopus boletus* a dvakrát *M. laminarius*. Poměrně nepřehledná a s mizivou podporou u většiny větví je situace mezi izoláty, kterou jen pro přehlednost následného morfologického představení nazývám asambláží HY (podle druhů *M. hasei* a *M. yantaiensis*, jež zahrnuje). Soliterně pak stojí linie 4PIRAN a SIERRA. V jejich případě se také liší topologie stromu vzešlého z ML a Bayesovy analýzy. ML analýza rovněž mírně podpořila, nebo spíše nevyloučila (55 (BS)) existenci rodu *Atopospira*. Zcela nejasnou pozici dále má i *Idiometopus turbo*. Bayesova analýza umístila skupinu těchto tří druhů na bázi skupiny IAC, což byla jediná větší topologická odchylka obou výsledků analýz. Analýza také ukázala existenci linie provizorně nazvané S (mimo IAC). Ta se dále rozpadá na linii S1 (*Metopus es* a sekvence izolátů KARBA a ROMLOX) a S2 (MEDNIK3G, KUPINOVO, SCHWARZSEE NB).

4.4 Morfologické představení nalezené diverzity

Pro morfologickou charakteristiku byly využity standardní ciliatologické metody: pozorování živých buněk, barvení fixovaných buněk pomocí protargolu nebo uhličitanu stříbrného. Pro charakteristiku jednotlivých izolátů používám běžnou terminologii (viz oddíl Základní morfologie metopidů). Délky uvádím na základě pozorování živých buněk, což je konzistentní s tradičně udávanými údaji.

Jako nestandardní terminologii využiji ještě nové provizorní pojmosloví týkající se jaderného aparátu, který se ukázal jako důležitý determinační prvek v rámci skupiny IAC. Jaderným aparátem myslím spojení makro- a mikronukleu, protože u metopidů skupiny IAC můžeme najít vždy jeden mikro- a jeden makronukleus v těsné blízkosti. Obvykle se charakterizuje tvar a poloha makronukleu a jeho vztah k mikronukleu zvlášť. Pro potřeby této práce bude výhodnější zavést čtyři typy celého jaderného aparátu než jádra sáhodlouze opakovaně popisovat. Typ jaderného aparátu bude definován jako tvar makronukleu a jeho vzájemná pozice s mikronukleem. Pozorované typy jsou následující:

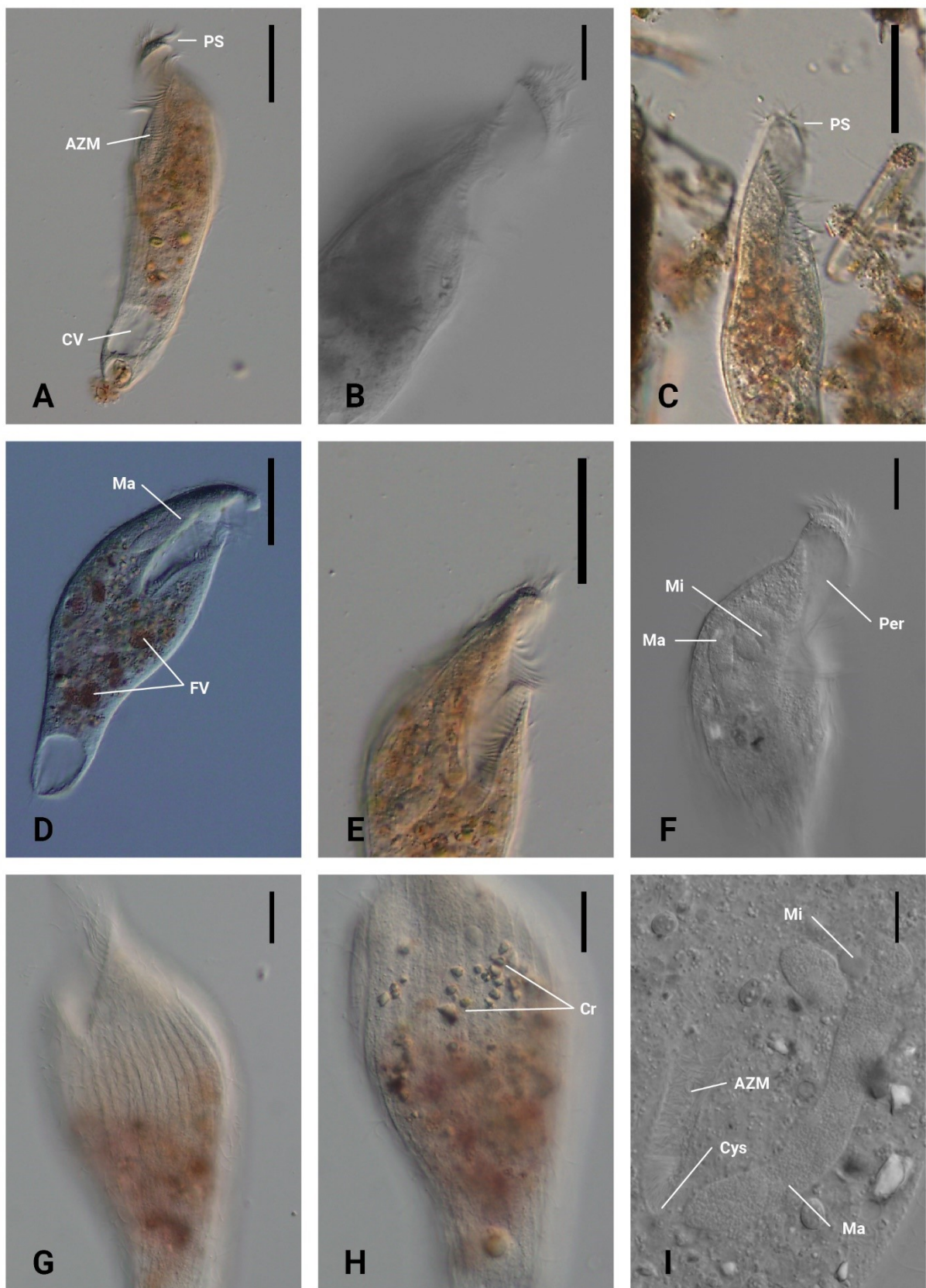
- „íčkový“ – makronukleus je podlouhlý až červovitý, obvykle rovný, příp. mírně stočený v posteriorní části a mikronukleus je umístěn na anteriorním konci makronukleu. Výsledný tvar tedy připomíná písmeno “i”;
- „oválný“ – makronukleus je elipsoidní nebo oválný, širší a kratší než u „íčkového“ typu a mikronukleus na něj nasedá subapikálně, resp. postranně vždy v anteriorní polovině makronukleu;
- „céčkový“ – makronukleus je podlouhlý, někdy mírně zkroucený a obvykle (zejména po fixaci) prohnutý do tvaru písmene „c“, mikronukleus nasedá v ekvatoriální části v ohybu makronukleu, mikronukleus může sedět v jamce, jako by zasazen do makronukleu;
- „kulový“ – makronukleus je kulovitý s četnými výraznými jádérky, mikronukleus přisedá obvykle v anteriorní polovině makronukleu.

Morfologické charakteristiky jednotlivých izolátů velmi dobře kopírují linie A, B a C odhalené v rámci fylogenetické analýzy. Také asambláž HY vykazuje společné rysy. Opět soliterně stojí SIERRA, o něco méně už 4PIRAN, který má morfologicky blízko k asambláži HY. Nutno ještě podotknout, že *Metopus boletus* z linie C má oválný až kulovitý makronukleus, na rozdíl od „céčkového“ typu ostatních zástupců (Vďačný & Foissner 2019). Podobný globulární tvar makronukleu vykazuje i rod *Atopospira* (Bourland & Wendell 2014). *Idiometopus turbo* má červovitý a spirálovitý makronukleus s mikronukleem sedícím po straně (Bourland et al. 2018b). Ve studii je jeho tvar označován jako „ve tvaru C“ (Bourland et al. 2018b), liší se však od typu, který v této práci nazývám „céčkový“, délkou, tvarem i umístěním mikronukleu. Ve všech jmenovaných případech se však jedná o morfologicky velmi odlišné buňky v porovnání s ostatními metopidy skupiny IAC. Všechny mé izoláty jsou přehledně představeny v následujícím oddílu.

SIERRA

Velmi velký metopid patřící mezi největší známé o délce kolem 215–235 μm a šířce okolo 60–70 μm . Adorálních membranel je kolem 30. Stavbou anteriorní části buňky se výrazně liší od zbytku izolátů popisovaných v této práci. Preorální dóm je zakončen plochým štítem (obr. 6 C). Peristom je mimořádně široký a ačkoli je preorální dóm mírně torzní, nevytváří typický úzký kanál pro adorální membranely, ale je poměrně doširoka otevřený (obr. 6 D, E a F). Jaderný aparát je atypický. Makronukleus je červovitý a stočený. Mikronukleus na něj nasedá mezi záhyby. Kaudální cilia jsou přítomná, ačkoli špatně patrná. Výrazným znakem jsou rhodobakterie v potravních vakuolách, které barví buňku od rudé po zlatavě hnědou barvu (obr. 6 D). (Více k determinaci viz diskuze.)

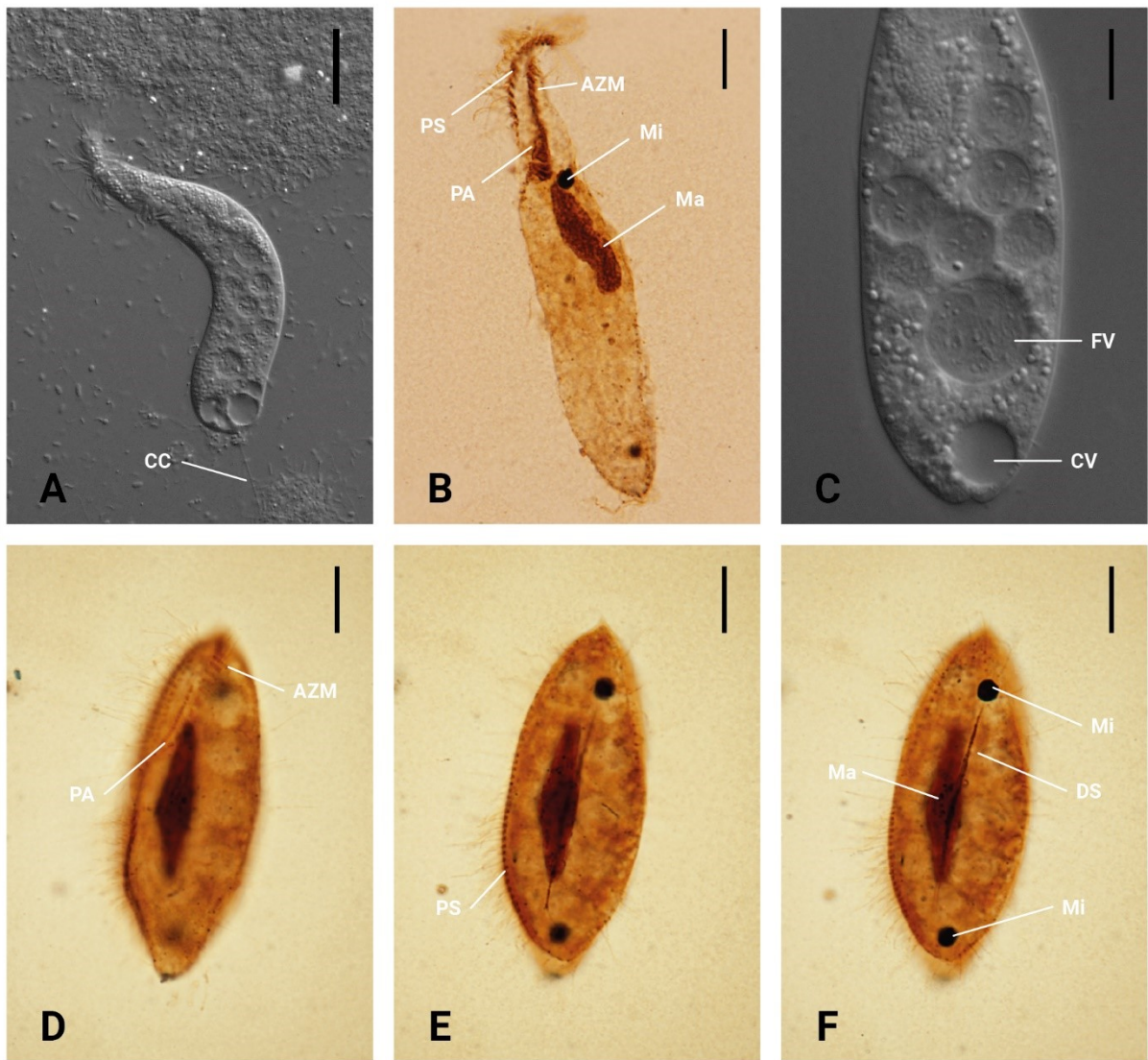
Tento organizmus byl prvně izolován a sekvenován v roce 2020, nepodařilo se však najít více než tři buňky. Po roce se podařilo ze stejné lokality získat nový vzorek s hojnějším zastoupením izolátu SIERRA. Mohl jsem tak verifikovat předchozí nález novou sekvenací a pořídít více mikrofotografií. Pokusy o barvení protargolem přinesly zatím slabé výsledky. Tentokrát se organizmus podařilo udržet ve vzorku výrazně déle tím, že nebyl pevně uzavřen a byl tedy částečně okysličován a umístěn na světlo kvůli růstu rhodobakterií. Nepředpokládám, že by SIERRA vyžadoval kyslík pro svůj metabolismus, ale spíše že je potřeba udržet částečně ekologické vztahy z původního habitatu v rámci vzorku.



Obr. 6 Izolát SIERRA (A–I). C (bright field), ostatní (DIC). CV = kontraktilní vakuola, AZM = zóna adorálních membranel, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, Cr = nápadné kortikální krystaly či granula, Per = široký peristom, FV = charakteristická potravní vakuola s rhodobakteriemi, Cys = cytostom. Škály: 50 μm (A, C, D, E), 20 μm (B, F, G, H), 10 μm (I).

4PIRAN

Středně velký metopid o délce 100 μm se zónou asi 15 adorálních membranel, počtem falešných kinet okolo 20 a velmi subtilním preorálním dómem s torzí v samotném anteriorním konci. Počet somatických kinet není znám pro nepřilíš kvalitní barvení protargolem. Jaderný aparát je „íčkového“ typu (obr. 7 C). Kaudální cilia jsou přítomná (obr. 7 A). Nezřídka v kultuře produkuje protáhlé a štíhlé „slender“ formy, které mohou být součástí životního cyklu nebo reakce na nepřírozené podmínky kultivace. Podle pozorování provedeném na druhu *Heterometopus palaeformis* (Esteban et al. 1995) se dá předpokládat, že jde o stádium životního cyklu před encystací, což musí být v tomto případě teprve potvrzeno experimentálně. Jde o poměrně náročný izolát na kultivaci. Buňky se často hromadně encystují na poměrně dlouhou dobu a trofozoiti úplně vymizí z kultury. Cysty ani po výměně média nereagují. Po nějakém čase, klidně v řádu let, se ve staré kultuře opět excystují. Jako efektivní pro udržení aktivních buněk v kultuře se ukázalo „předočkování“ nového média několik dní předem bakteriemi z původní kultury a až následné přenesení metopidů. U snadno kultivovatelných linií není tento postup nutný.



Obr. 7 Izolát 4PIRAN (A–F). A, C (DIC), B, D–F (protargol). D–F dělicí se buňka. CV = kontraktlní vakuola, AZM = zóna adoralních membranel, PA = paroralní membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, CC = kaudální cilia, FV = potravní vakuola, DS = dělicí vřeténko. Škály: 20 μm (A), 10 μm (B–F).

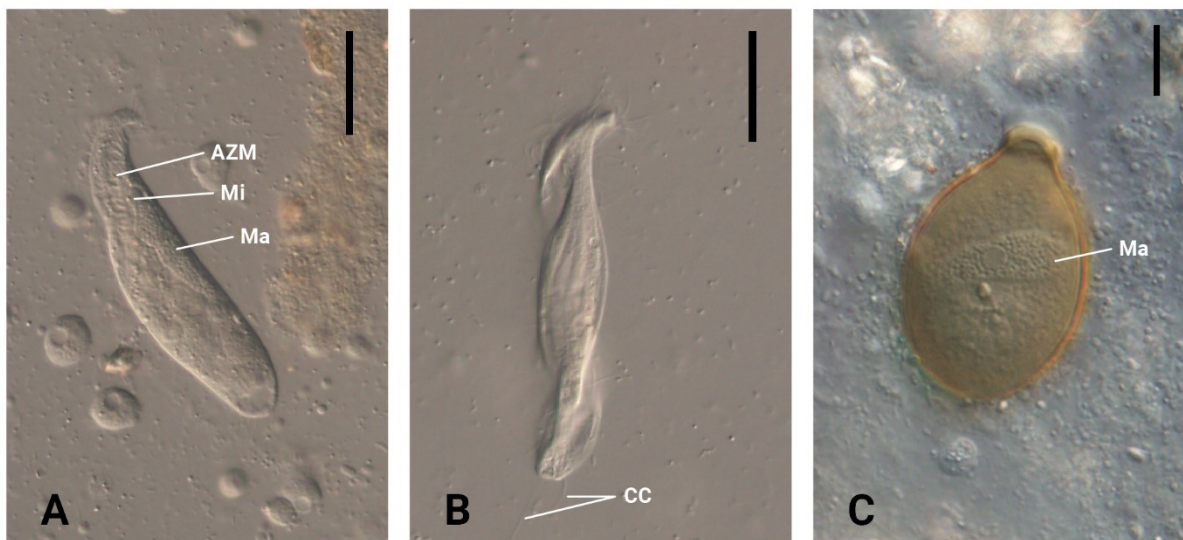
Asambláž HY

Používám zde pracovní pojmenování asambláž, neboť jde o několik izolátů s nejasnými vztahy a povětšinou mizivou statistickou podporou topologie v rámci provedené analýzy. Tyto linie jsou si, pokud jde o gen pro 18S rRNA, sekvenčně velmi podobné a kvůli nedostatečné sekvenční variabilitě není možné odhalit jejich vzájemné vztahy. V rámci analýz se vždy ukazují v blízkém vztahu s již známými sekvencemi publikovanými jako *Metopus hasei* sensu Vďačný et al. (2019) a *M. hasei* sensu Omar et al. (2017). Dále pak s popsáním druhem *M. yantaiensis* (Omar et al. 2017). Na základě morfologie sem lze provizorně přiřadit i morfologický druh *M. inversus* s nápadně podobnými morfologickými charakteristikami jako *M. yantaiensis* (srov. Foissner & Agatha 1999; Omar et al. 2017). I mé izoláty podle analýzy blízké jmenovaným druhům vykazují podobnost buď s *M. hasei*, nebo s *M. yantaiensis*.

Z nově získaných izolátů sem patří CAGACI, GRIDI MO4, KENHO1, ANNZ9Q, KENHO2, LIPKY11H a SEMATRY. Najdou se zde středně velcí i velcí metopidi. Mají výraznou (dvojitou) torzi preorálního dómu, který je navíc zploštělý. Apikální část buňky tedy laicky řečeno připomíná vývrtku nebo vrut. Zejména při pohybu vpřed je tvar jasně patrný a pohyb charakteristický. Jaderný aparát je buď „íčkový“, nebo „oválný“. Tento dříve opomíjený znak by mohl posloužit při determinaci, neboť (podle současného stavu poznání) rozděluje asambláž HY na skupinu kolem *M. hasei* sensu Vďačný et al. (2019) s „íčkovým“ jaderným aparátem a skupinu s „oválným“ jaderným aparátem kolem *M. yantaiensis*.

CAGACI, GRIDI MO4

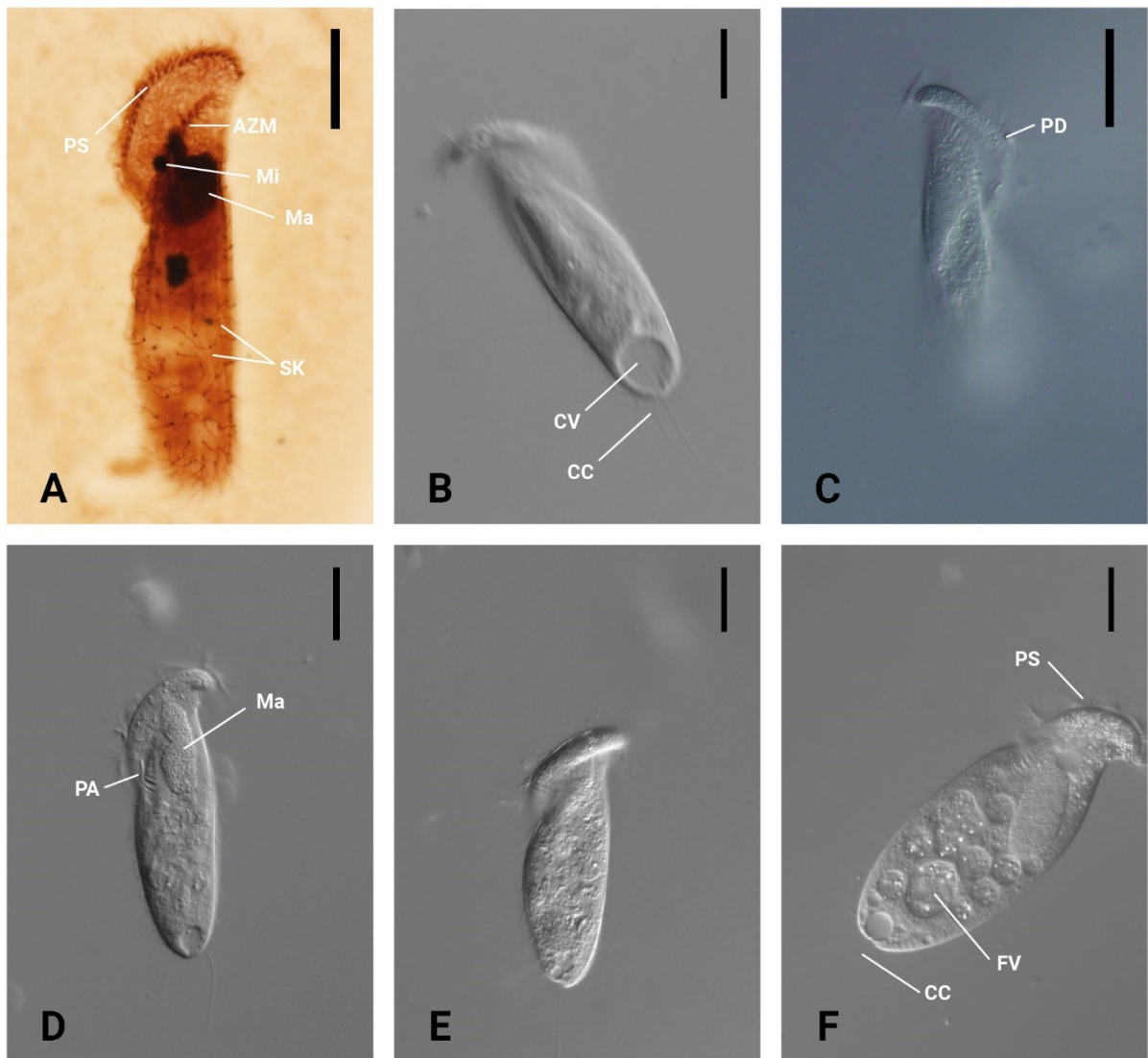
Oba izoláty mají identickou sekvenci genu pro 18S rRNA. Jde o izoláty, které jsou v rámci mé fylogenetické analýzy nejpříbuznější publikovaným sekvencím pro druh *Metopus hasei* z australské populace (Vďačný et al. 2019). Morfologicky jsou si izoláty také velmi podobné. A s délkou asi 70–90 µm, šířkou 20–30 µm, asi 13 adorálními membranelami a nejčastěji „íčkovým“ jaderným aparátem se v tomto velmi povrchním ohledu podobají populaci *M. hasei* publikované Vďačným (2007). Nicméně pro jistější soud bude potřeba detailnější morfologické zkoumání. Izolát GRIDI MO4 má neobvykle velkou produkci cyst (obr. 8 C), čímž se jeví jako vhodný kandidát pro případné studium faktorů encystace. Obě kultury jsou trvale nadprůměrně abundantní.



Obr. 8 Izolát GRIDI MO4 (A–C). A–C (DIC), C – Cysta. CV = kontraktlní vakuola, AZM = zóna adoralních membranel, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, CC = kaudální cilia. Škály: 20 μm (A, B), 10 μm (C).

ANNZ9Q, KENHO1 a LIPKY11H

Sekvenčně blízce příbuzné linie z České republiky (ANNZ9Q, LIPKY11H) a Keni (KENHO1). Jde o středně velké metopidy o délce okolo 100 μm , šířkou 30–40 μm a „oválným“ jaderným aparátem. Na první pohled působí buňky robustněji než izoláty CAGACI a GRIDI MO4. Preoralní dóm je širší než u jmenovaných izolátů a velmi plochý s výraznou torzí (obr. 9 C). Podobně jako ještě robustnější izolát KENHO2 obecným tvarem těla připomíná popsané druhy *M. yantaiensis* (Omar et al. 2017) a *M. inversus* (Foissner & Agatha 1999). Izolát KENHO1 bohužel zanikl hned po několika dnech od objevení a podařilo se získat jen několik málo buněk pro izolaci DNA a DIC mikrofotografie. Ve všech třech případech jde o velmi obtížně kultivovatelné linie. KENHO1 se nepodařilo kultivovat vůbec. Buňky LIPKY11H byly velmi abundantní ve vzorku, nicméně po začátku kultivace v cerofylovém médiu počty rychle poklesly ve prospěch jiných nálevníků jako *Trimyema* sp. a *Heterometopus* sp. a následně trofozoiti z kultury zcela vymizeli. K udržení kultur bude v tomto případě zřejmě potřeba vytvořit speciální médium. ANNZ9Q se nedaří udržet v kultuře déle než jeden měsíc. Na rozdíl od KENHO1 se však ANNZ9Q podařilo opakovaně obnovit z původního půdního vzorku. Je tedy naděje, že při dostatečném množství cyst ve vzorku bude možné všechny tři kultury znovu obnovit a experimentálně najít vhodné médium.



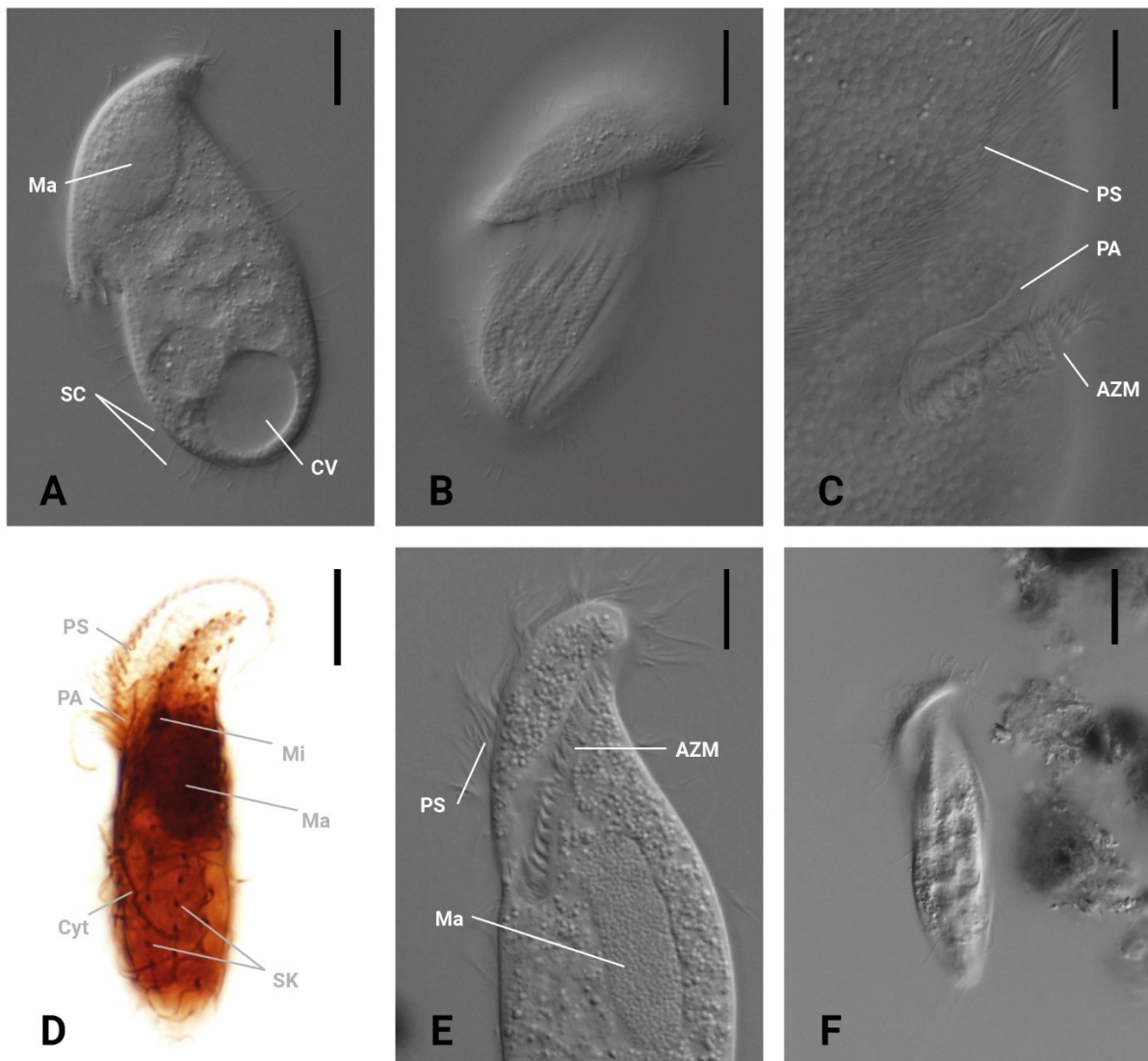
Obr. 9 Izolát ANNZ9Q (A–C), LIPKY11M (D, E), KENHO1 (F). A (protargol), B–F (DIC). CV = kontraktální vakuola, PD = preorální dóm, AZM = zóna adorálních membranel, PA = parorální membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, CC = kaudální cilia, FV = potravní vakuola, SK = somatické kinety. Škály: 20 μ m (A–F).

KENHO2

Potenciálně velmi zajímavá linie, sekvenčně poměrně blízkce příbuzná a morfologicky podobná druhu *Metopus yantaiensis* (Omar et al. 2017). Spíše velký a velmi robustně působící metopid o délce asi 110 μ m a šířce okolo 60 μ m, což znamená, že poměr délky a šířky je v tom případě menší než 2:1 (obr. 10 A). Tím se podobá ještě jednomu fylogeneticky vzdálenějšímu druhu ze skupiny IAC, *M. boletus* (Vďačný & Foissner 2019). KENHO2 je však skoro dvakrát delší a širší a torze preorálního domu je výrazně větší. Jaderný aparát je „oválný“. Podobně jako z izolátu KENHO1 i z KENHO2 se podařilo získat jen jednotlivé buňky na izolaci DNA a několik fotografií. Obnovení ze vzorku se zatím nepodařilo ani mou, ani „Foissnerovou metodou“ s Petriho miskou. V tomto přídě byly navíc buňky mimořádně citlivé na manipulaci, takže se stěží podařilo vyfotit buňku v přirozeném tvaru.

SEMATRY

Středně velký metopid o délce asi 85–95 μm , šířce asi 20–25 μm . Preorální dóm je s pro tuto skupinu typickou torzí a silně zploštělý. Počet adorálních membranel je okolo 14. Jaderný aparát je „oválný“. Název tohoto izolátu je odvozen od místa nálezu na Radlickém hřbitově v kamenném odtoku vodní pumpy zaneseném tlejícím rostlinným materiálem. Plovoucí buňky se objevily ve vzorku vody s rostlinným detritem až asi po dvou měsících, zřejmě po vyčerpání kyslíku ve vzorku. Založená kultura je stabilní a poměrně abundantní.



Obr. 10 Izolát KENOHO2 (A–C), SEMATRY (D–F). D (protargol), ostatní (DIC). CV = kontraktlní vakuola, AZM = zóna adorálních membranel, PA = parorální membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, SC = somatické bičíky, FV = potravní vakuola, SK = somatické kinety, Cyt = cytofarynx. Škály: 20 μm (A, B, D, F), 10 μm (C, E).

Linie A

Linie A představuje ve skupině IAC jedinou brakickou či mořskou linii v rámci jinak sladkovodních metopidů doložených molekulárními daty. Vnitřní linií této skupiny je potom *Parametopidium circumlabens*, endosymbiont ježovek, tedy mořských organismů. Patří sem izoláty: IRAN2C, SK, EBRO2A, ADAO1, ELJAD1, ALB11 a KORISSION. Podařilo se získat sedm izolátů, které nejspíš představují 3–4 linie na úrovni druhu. Morfologicky je skupina poměrně uniformní. Vyznačuje se protáhlejšími buňkami s poměrem délky a šířky i přes 4:1. Preorální dóm je srpovitý, což je dobře vidět na barvených preparátech. V porovnání s linií C je však subtilnější. Typická jsou dlouhá kaudální cilia. Jaderný aparát je u této skupiny „íčkový“, alespoň u volně žijících izolátů (obr. 11 A–C, G). Výjimku v rámci linie tvoří *Parametopidium*, které má nejspíš „oválný“ jaderný aparát a i celkově se morfologicky značně odlišuje od zbytku skupiny (srov. Silva-Neto et al. 2016).

IRAN2C

Středně velký metopid o délce kolem 80 μm a šířce okolo 20 μm , s přibližně 16 adorálními membranelami. Dobře prosperuje jak ve sladkovodním médiu (ATCC 802), tak v brakickém médiu (viz oddíl Materiály a metody). Zatím jsem nepozoroval výrazné rozdíly v abundanci nebo změnu morfologie. Původní kultura držena po několik let zanikla, ale podařilo se ji obnovit z původního vzorku. Přestože byl izolát původně držen v brakickém médiu, nepodařilo se jej ze vzorku vzkřísit přidáním tohoto média.

ADAO1, EBRO2A, SK

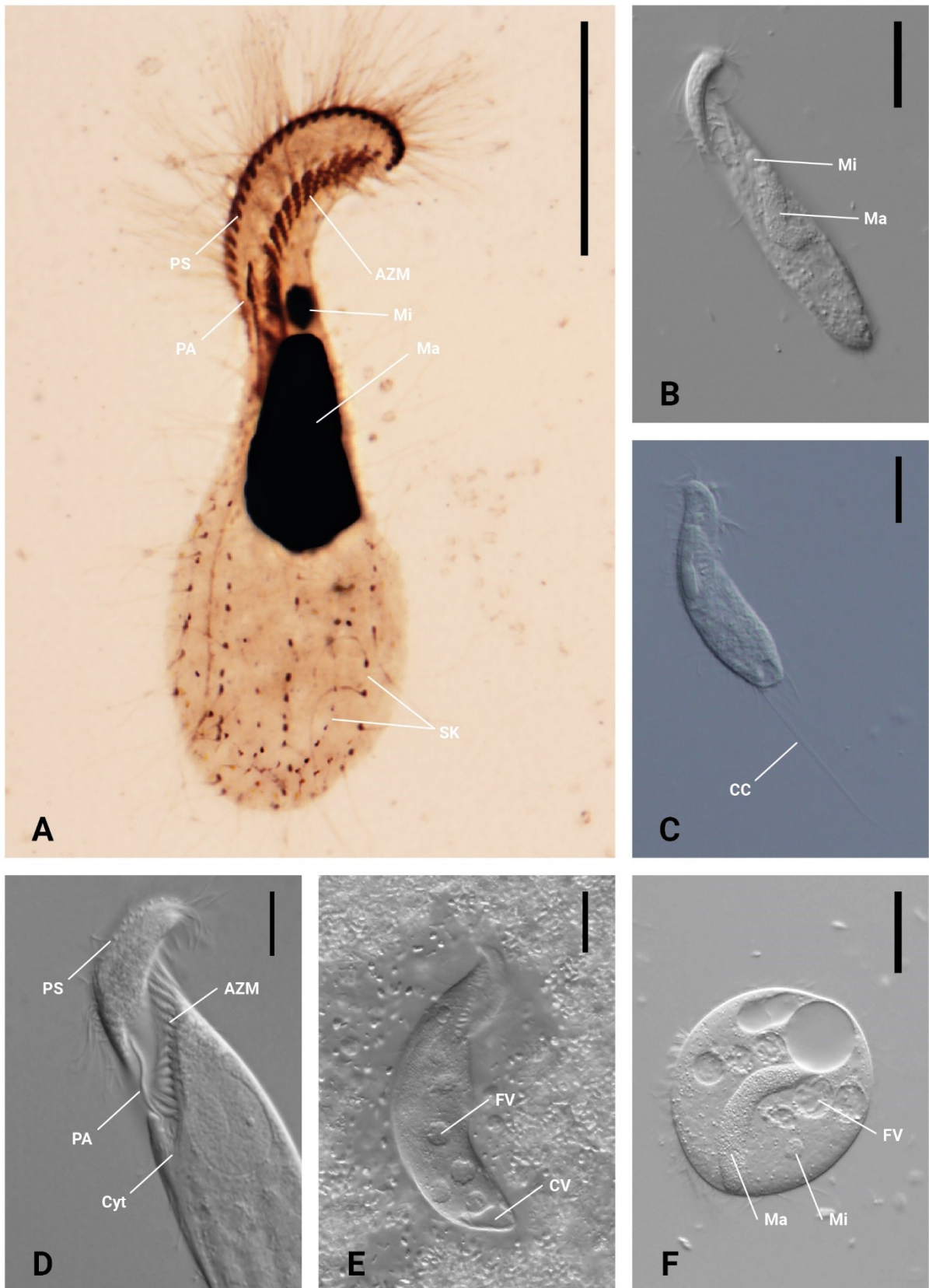
Středně velký metopid o délce kolem 80 μm a šířce okolo 20 μm , s až 19 adorálními membranelami a dlouhými kaudálními cilií. Kultura SK je držena v SW médiu, zatímco kultura EBRO2A v brakickém. ADAO1 je bohužel ztracený izolát, nicméně jsou k dispozici barvené exempláře a sekvence identická s EBRO2A. Toleranční pokusy se salinitou nebyly v rámci těchto kultur zatím provedeny.

ALB11, EIJAD1

Středně velký metopid o něco větší než předchozí izoláty. Dosahuje délky okolo 100–110 μm a šířky 20 μm a má přibližně 20 adorálních membranel. Izoláty mají identické sekvence a jinak se morfologicky nijak neliší.

KORISSION

Středně velký a velmi štíhlý metopid, alespoň pokud se dá soudit podle protargolem barvených exemplářů. Izolát byl již použit v rámci diplomové práce J. Rotterové (2015). Bohužel se kulturu nepodařilo udržet a původní vzorek není dostupný.



Obr. 11 Izolát SK (A, B), EBOR2A (C), ALB11 (D), IRAN2C (E, F). A (protargol), ostatní (DIC). F – Postdivider. CV = kontraktlní vakuola, AZM = zóna adorálních membranel, PA = parorální membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, CC = kaudální cilia, FV = potravní vakuola, SK = somatické kinety, Cyt = cytofarynx. Škály: 20 μ m (A–C, E, F), 10 μ m (D).

Rod *Atopospira*

Ve dvou případech (KOSIC2 a CEPIMAL AG) se podařilo izolovat DNA z jednotlivých buněk druhu *Atopospira galeata* (Kahl, 1927). Sekvence se plně shodují s publikovanou sekvencí populace z Idaho, USA (Bourland & Wendell 2014), nikoli však s publikovanou sekvencí z australské populace (Vďačný et al. 2019). Organismy se nepodařilo udržet v kultuře déle než měsíc. Nezdar při kultivaci konstatují i autoři Bourland & Wendell (2014). V přírodních vzorcích má téměř vždy trávici vakuoly naplněné rhodobakteriemi (Kahl 1927; Bourland & Wendell 2014; vlastní pozorování). *Atopospira galeata* je zřejmě potravně závislá na přítomnosti těchto bakterií a při jejich nepřítomnosti z kultury rychle vymizí.

Linie B

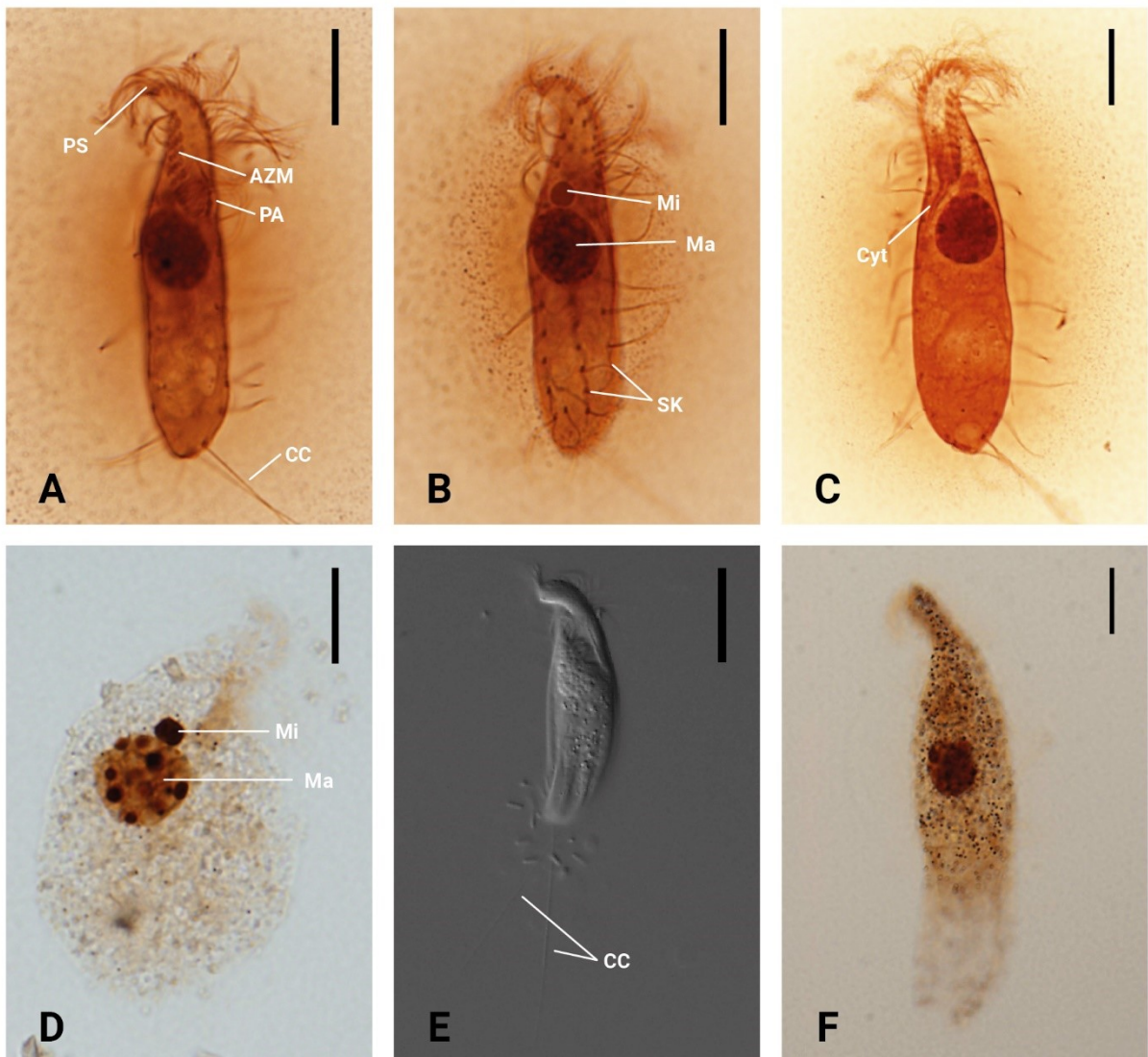
Zcela nová linie, k jejímž zástupcům se těžko hledají věrohodné paralely ve starší literatuře. V každém případě její součástí není žádná sekvence popsáního druhu. Patří sem izoláty: HOSLIR, VELKAL XXA, SLAN1FS, LIPKY11M, ANNZ8, DARTHWOOD, SCHWARZSEE, HOVERLA, KRUMLI a MALKAL XC.

Nejpříbuznější se podle výsledku fylogenetické analýzy jeví *Metopus minor* sensu Vďačný et al. (2019). Jde o malé až velmi malé metopidy ve velikostech od 30 do 70 μm . Je pro ně charakteristický obecný tvar preorálního dómu bez výrazné torze, malý počet adorálních membranel (do 9), dlouhá kaudální cilia přesahující délku buňky a specifický jaderný aparát „očkového“ typu. Na rozdíl od linií podobných *M. hasei* a *M. yantaiensis* se dají příslušníci této linie poměrně snadno identifikovat jak podle tvaru, tak zejména podle jaderného aparátu. Od *M. minor* sensu Çapar (2007) se liší výrazně menším počtem adorálních membranel (nejvýše 9 vs 15). Většinu izolátů z této skupiny se nepodařilo kultivovat. Zato je možné je vcelku úspěšně obnovovat z původních vzorků. Kromě izolátu LIPKY11M pocházejí všechny izoláty z půdních vzorků, nejčastěji z břehů vodních těles (rybníky, říčky). LIPKY11M je pak z nádrže či rybníčku vytvořeného u pole, dá se tak předpokládat, že i v tomto případě je původ spíše půdní.

HOSLIR, VELKAL XXA

Malý metopid, současně však dosud největší známý z této linie, s délkou 60–70 μm a šířkou okolo 15 μm . Buňky mají 9 adorálních membranel a 9 somatických kinet, opět nejvíce z celé linie B. Má asi 14 falešných kinet a velmi dlouhá kaudální cilia. Má typický „očkový“ jaderný aparát s výraznými jádérky v makronukleu (obr. 12 D). Z izolátu HOSLIR se podařilo jen izolovat DNA bez fotografií a vypadalo to, že skončí jako environmentální sekvence. Asi po roce se však podařilo získat VELKAL XXA s identickou sekvencí z jiného půdního vzorku ze stejné lokality Hostivických rybníků. Při fylogenetické analýze se

ukázalo, že je velmi blízce příbuzný (patrně stejný druh) environmentální sekvenci z půdního vzorku ze břehu řeky Colorado v areálu bývalého uranového dolu (Rifle, Colorado, USA) (Holmes et al. 2013).



Obr. 12 Linie B. Izolát VELKAL XXA (A–F). A–C (protargol), D, F (uhlíčitan stříbrný), E (DIC). F je příklad nežádoucího obarvení kortikálních granul. AZM = zóna adorálních membranel, PA = parorální membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, CC = kaudální cilia, SK = somatické kinety, Cyt = cytofarynx. Škály: 20 μm (E), 10 μm (A–D, F).

SLAN1FS

Velmi malý metopid s délkou asi 50 μm a šířkou okolo 17 μm . Dosud se podařilo pořídit DIC mikrofotografie pouze z jediné buňky, proto jsou uvedené rozměry jen velmi přibližné. Silně připomíná izoláty ANNZ8 a DARTHWOOD, nicméně se zdá, že by mohl mít více než osm adorálních membranel.

LIPKY11M

Velmi malý metopid s délkou asi 40 μm a šířkou okolo 15 μm . Dosud se podařilo pořídit DIC mikrofotografie pouze z jediné buňky, proto jsou uvedené rozměry jen velmi přibližné.

ANNZ8, DARTHWOOD, SCHWARZSEE

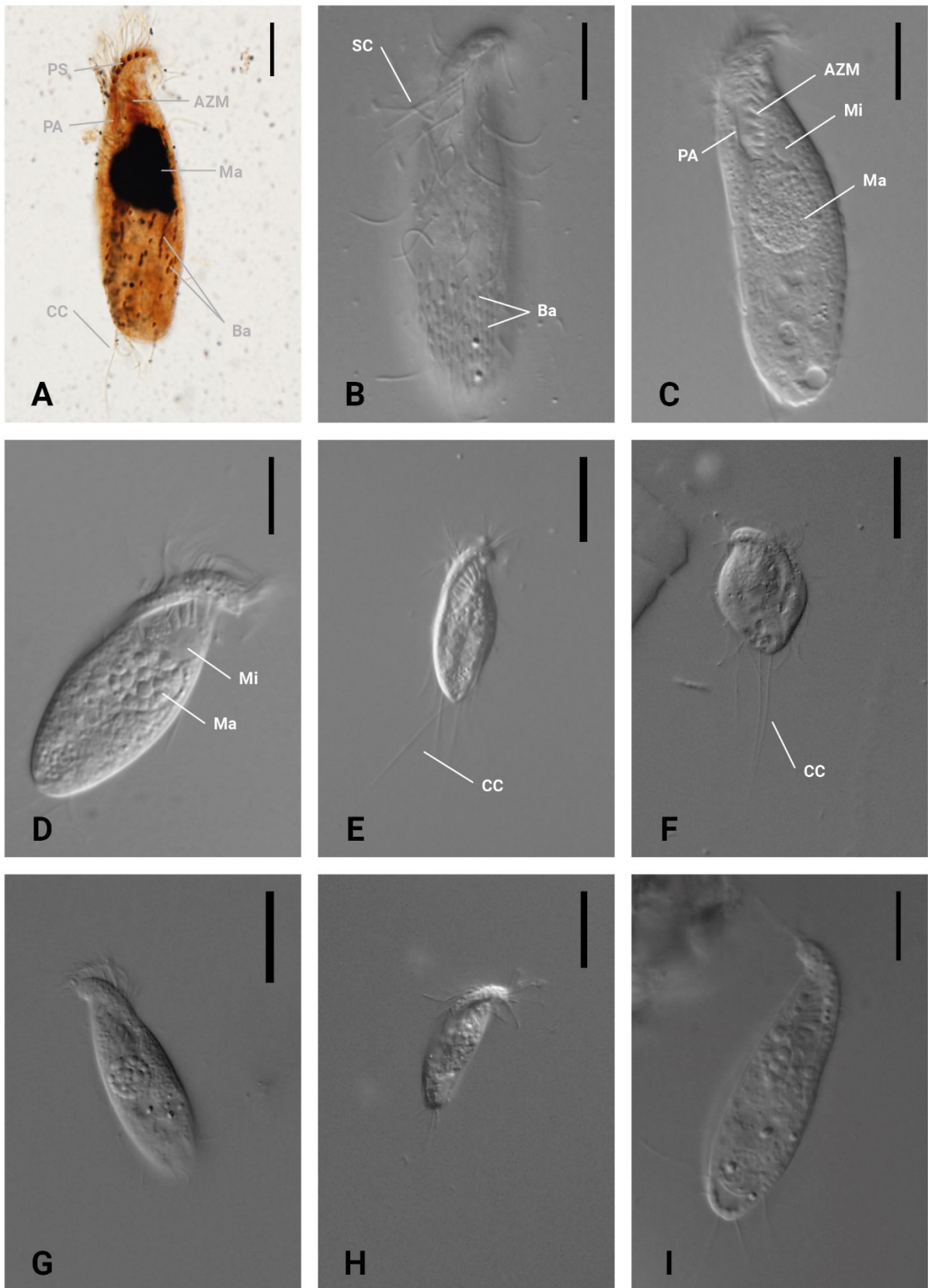
Velmi malý metopid s délkou asi 50 μm a šířkou okolo 15 μm . Obvykle má osm adorálních membranel a osm somatických kinet. DARTHWOOD se zatím daří držet v kultuře, nicméně nepříliš abundantní. ANNZ8 tak představuje jediný opravdu dlouhodobě kultivovatelný izolát z celé linie B. Zároveň lze jeho kultury obnovovat z původního vzorku. U tohoto izolátu byly navíc pozorovány ektosymbiotické bakterie (obr. 13 A, B).

HOVERLA

V současné době je mi dostupná pouze sekvence genu pro 18S rRNA bez dalších dat.

KRUMLI, MALKAL XC

Velmi malý metopid s délkou asi 30–40 μm a šířkou okolo 15 μm . V tomto případě se podařilo zachytit dva morfotypy. KRUMLI má konvenční fenotyp linie B, zatímco MALKAL XC vykazoval neobvyklý tvar. Přestože KRUMLI byl po jistou dobu poměrně abundantní, když se náhle objevil v asi rok starém vzorku, nepodařilo se jej nakonec, stejně jako MALKAL XC, kultivovat.



Obr. 13 Linie B. Izolát ANNZ8 (A–C), KRUMLI (D, E) MALKAL XC (F), SLAN1FS (G), LIPKY11M (H), DARTHWOOD (I). A (uhlíčen stříbrný), ostatní (DIC). AZM = zóna adorálních membranel, PA = parorální membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, CC = kaudální cilia, FV = potravní vakuola, SC = somatické bičíky, Ba = ektosymbiotické bakterie. Škály: 20 μ m (E, F, H), 10 μ m (A–D, G, I).

Linie C

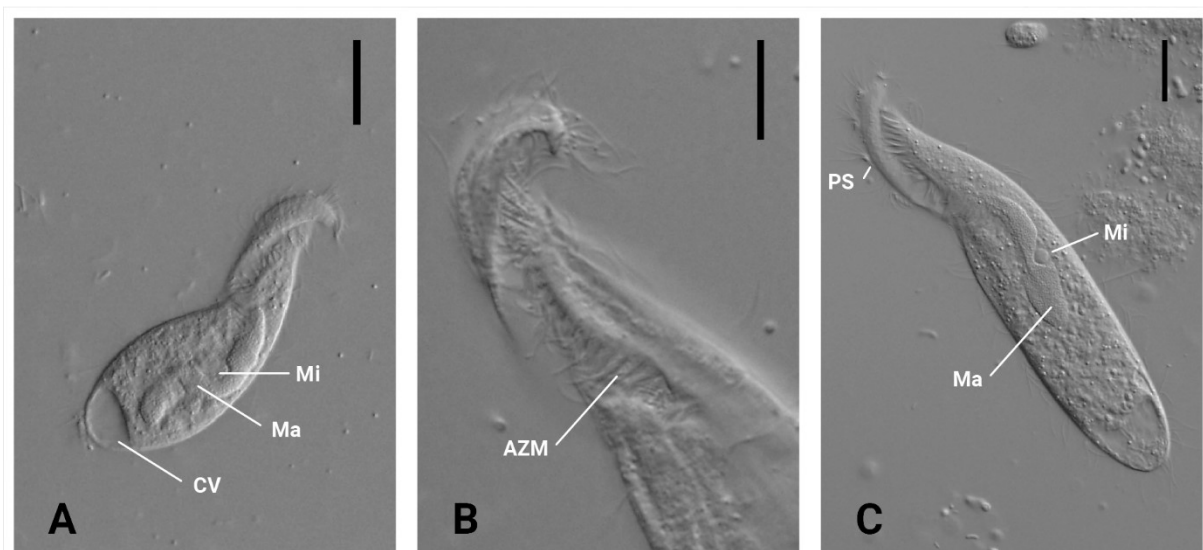
Třetí dobře podpořená linie v rámci fylogenetické analýzy je skupina zahrnující popsany druh *Metopus boletus* a používaný, leč moderními metodami nepopsaný druh *M. laminarius*. Obsahuje 4 izoláty (ALOOA1, LERMA4, HRAD2AN a MEDI3L) představující zřejmě 1–2 druhy. Mé izoláty se vyznačují charakteristickou mohutně srpovitou anteriorní částí preorálního dómu, „céčkovým“ typem jaderného aparátu (obr. 14 A, C) a jen nepatrně prodlouženými kaudálními cílii délkou skoro nerozlišitelnými od somatické ciliatury. Jde o středně velké a velké metopidy s délkou až kolem 150 μm . Obvyklým původem izolátů je tlející sladkovodní sediment. V kulturách jsou tyto izoláty obvykle velmi abundantní.

ALOOA1

Tento izolát byl již představen v diplomové práci J. Rotterové (2015). Jde o středního až velkého metopida v délce asi 90–120 μm a šířce 20 μm . Celkově působí jako mírně zmenšená verze níže detailně popsaného druhu *Metopidae* sp. C1.

HRAD2AN, LERMA4, MEDI3L

Velký metopid o délce 140–150 μm a šířce asi 30 μm . Všechny izoláty vykazují stejnou morfologii detailně popsanou níže. Sekvence izolátů HRAD2N a MEDI3L použité v rámci fylogenetické analýzy se zcela shodují s publikovanou sekvencí pod názvem *Metopus laminarius* (Bourland et al. 2014).



Obr. 14 Linie C. Izolát ALOOA (A, B), LERMA 4 (C). A–C (DIC). AZM = zóna adorálních membranel, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, CV = kontraktilní vakuola. Škály: 20 μm (A, C), 10 μm (B).

4.5 Detailní popis metopida ze skupiny IAC

Metopidae sp. C1 podle provedené fylogenetické analýzy patří do dobře podpořené linie C společně s druhy *Metopus boletus* (Vďačný & Foissner 2019) a dvěma sekvencemi publikovanými jako *M. laminarius* (Bourland et al. 2014; Vďačný et al. 2019). Jde o vůbec první ucelenější popis (podle současných standardů a včetně molekulárních dat) druhu metopida, který by mohl odpovídat morfologické formě, resp. druhu popsanému nejprve jako *Metopus laminarius f. hyalinus* (Kahl 1927) a následně povýšený na samostatný druh jako *M. hyalinus* (Kahl 1932). Problematiku a komplikace s identifikací právě domnělého druhu *M. laminarius* (případně jeho variant) podrobně rozebírám v diskuzi. Tuto linii jsem vybral také pro její běžné používání v rámci publikovaných fylogenetických analýz pod názvem *M. laminarius* (užité v Bourland et al. 2014). Zároveň jde o celkově obtížný druh na popis vzhledem k jeho nepoddajnosti při standardním barvení protargolem nebo jinými technikami. V rámci tohoto popisu tak poprvé ukazují úspěšné obarvení zejména orální ciliatury, a to jak protargolem, tak uhličitanem stříbrným. S ohledem na provedenou fylogenetickou analýzu úmyslně nepoužívám pro tento druh označení *Metopus* sp.1. Vzhledem k předpokládané konspecifitě izolátů MEDI3L a LERMA4 vyplývající z provedené fylogenetické analýzy a p-distanci 0,001 (hluboko pod hranicí 0,005 navrženou Bourland et al. (2020)) si dovoluji prezentovat oba izoláty společně jako jeden druh. Protargolem barvené buňky a morfometrická data jsou získána z izolátu MEDI3L (obr. 15), SEM fotografie a buňky barvené uhličitanem stříbrným jsou z izolátu LERMA4 (obr. 16, 17). (V případě barvení protargolem šlo u MEDI3L o jediný úspěšný pokus z mnoha provedených na izolátech MEDI3L, LERMA 4 a HRAD2AN.) V deskripci je použit postup a terminologie (částečně ztracená v překladu) podle Foissner & Agatha (1999) a Bourland et al. (2017b).

Metopidae sp. C1

Deskripce (izolát MEDI3L):

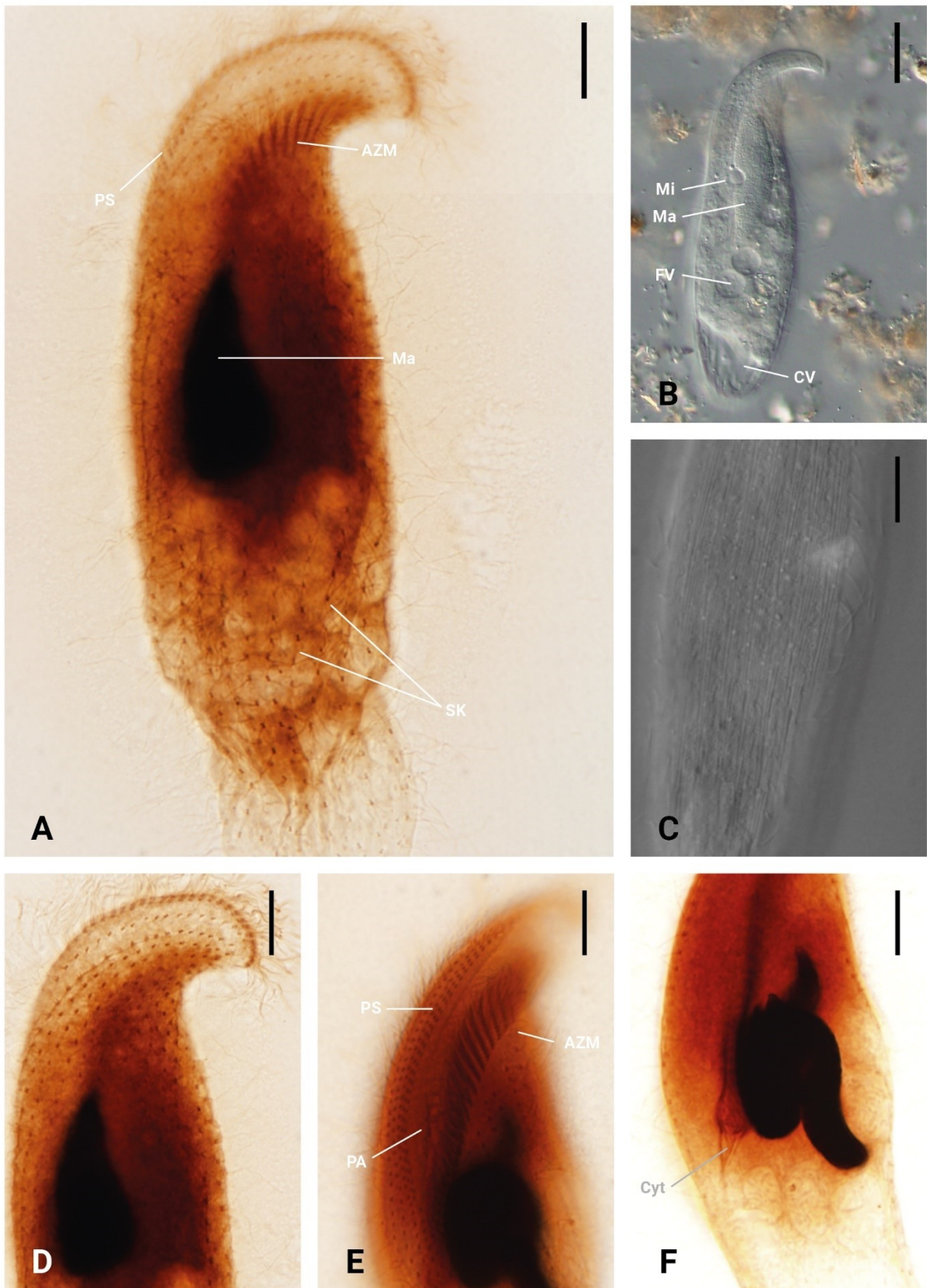
Buňka má podlouhlý nebo elipsoidní tvar. Nejširší je ve střední části. Anteriorní část je zploštělá a stočená až o 360° kolem hlavní podélné osy těla. Anteriorní konec buňky je srpovitý a výrazně přesahuje levý kraj buňky. Torzní a zploštělá anteriorní část šikmo přechází přes ventrální stranu a plynule přechází v dorzální povrch buňky. Posteriovní část buňky je oválná nebo dvojité konvexní. Posteriovní konec bývá zploštělý s mírně oblou a někdy i rovnou hranou. Kontraktilní vakuola je terminální. Živé buňky jsou dlouhé 153–201 μm a široké 24–44 μm , fixované a barvené protargolem pak dlouhé 96–142 μm a široké 19–35 μm . Průměrný poměr délky a šířky je 4,6:1. Buňky jsou bezbarvé. Makronukleus je červovitý obvykle připomínající tvar „C“ (u fixovaných buněk výrazněji) s mnoha kulovými jádřky ve velikosti okolo 1 μm . Mikronukleus je kulovitý nebo mírně elipsoidní a těsně naléhá na makronukleus („céčkový“ typ jaderného aparátu). Cytoprokt nejspíše terminálně a ventrálně, ale jednoznačně nepotvrzen. Kortex zformován do množství nepravidelných podélných vrás (obr. 15 D), flexibilní a s kortikálními granulami (obr. 15 C). V cytoplazmě rozptýleny svítivé objekty (patrně krystaly), tyčinkovití prokaryotičtí endosymbionti (nejspíš metanogenní archea). Pod nebo v kortexu větší množství kulovitých granul (obr. 15 B). Potravní vakuoly obsahují bakterie (obr. 15 B). Cysty nebyly pozorovány. Somatickou ciliaturu tvoří dikinetidy v anteriorní části obvykle nesoucí dva bičíky, v posteriovní nesoucí pouze jeden bičík na posteriovním bazálním tělísku. Podélné kinety jsou poměrně hustě umístěny s rozestupy asi 2 μm . Somatické bičíky měří kolem 10 μm . Kaudální bičíky o něco delší, ale nesehadno rozeznatelné. Perizonální pruh sestává vždy z 5 podélných kinet tvořících až 53 příčných falešných kinet. Preorální dóm je zploštělý. Vnitřní povrch peristomu je velký a tvoří úzký a hluboký kanál přesahující adorální membranely. Peristomální pole zabírá asi 2/5 délky buňky. Zóna adorálních membranel čítá průměrně 29 (27–33) membranel a táhne se od cytostomu po anteriorní konec buňky. Ve střední části je spirálně přehnutá. Adorální membranely jsou velmi úzké, tvořené dvěma řadami po zhruba 12 bazálních tělíscích. Poměrně dlouhá parorální membrána dosahující asi 40 % adorální zóny je umístěna na hraně peristomu a tvoří ji jedna řada bazálních tělísek. Cytofaryngeální vlákna jsou viditelná. Morfometrické údaje uvádím v tabulce 4.

Tab. 4 Morfometrické údaje izolátu MEDI3L

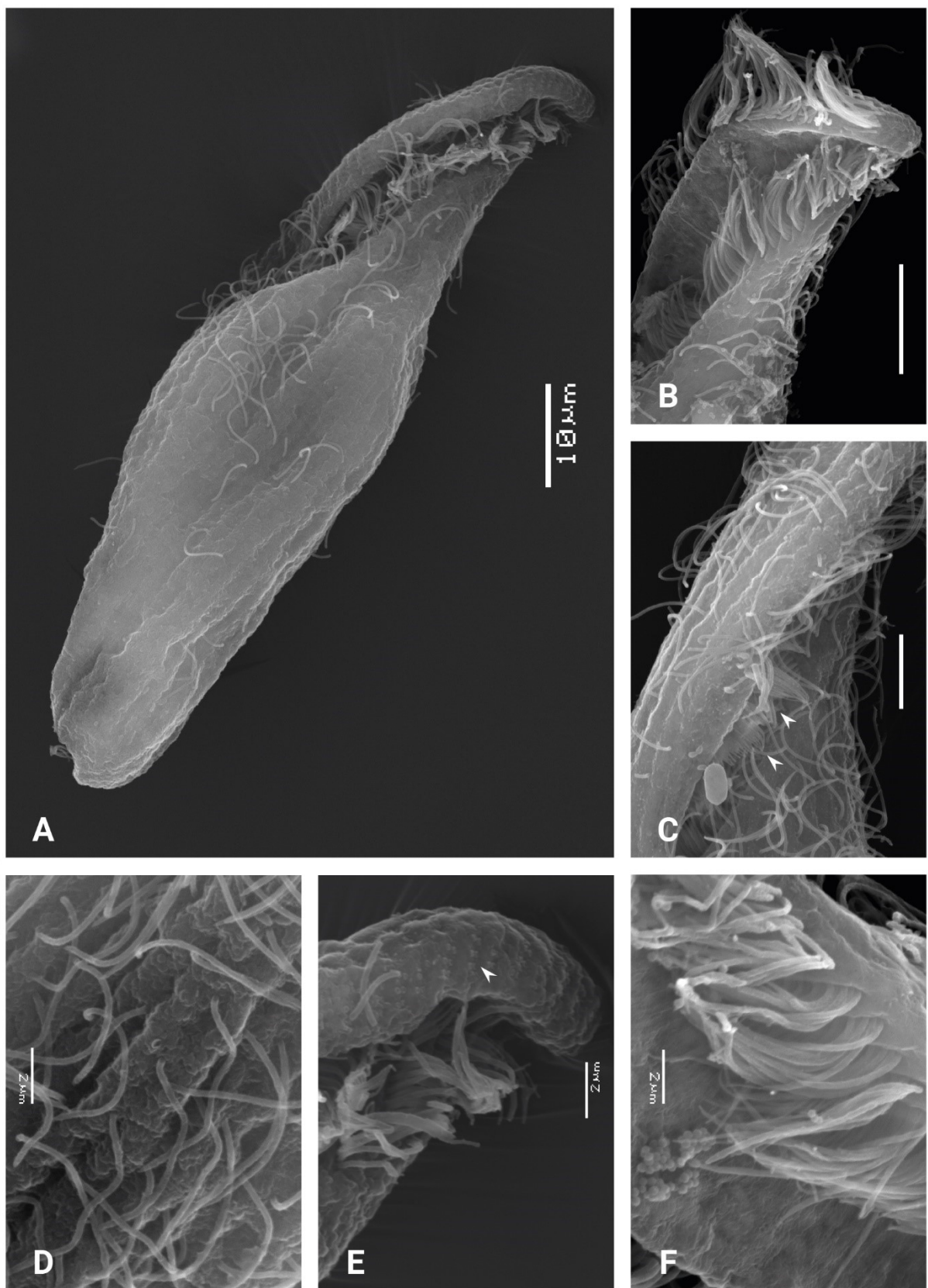
Charakteristiky	průměr	medián	SD	CV (%)	min.	max.	N
Délka (naživo)	173,4	174,6	14,8	8,5	152,8	200,6	24
Šířka (naživo)	33,0	32,3	4,9	14,8	23,5	43,5	24
Délka (p)	118,3	114,3	14,4	12,1	96,0	141,5	14
Šířka (p)	26,8	26,9	4,9	18,3	19,0	34,5	14
Poměr délky a šířky buňky (p)	4,6	4,5	1,1	23,5	3,1	7,3	14
Makronukleus, délka (p)	47,8	46,5	4,4	9,2	43,5	57,2	10
Makronukleus, šířka (p)	7,5	7	1,5	20,0	5,6	10,5	10
Mikronukleus, počet (p)	1	1	–	–	1	1	14
Mikronukleus, průměr (p)	3,4	3,4	0,5	14,7	2,5	4,1	10
Šířka středu AZM (p)	5,6	5,3	0,7	13,0	4,6	6,8	13
Parorální membrána, délka (p)	23,8	23,6	3,0	12,4	19,7	27,5	6
Poměr délky parorální membrány a délky buňky (p)	0,2	0,2	0,0	14,8	0,2	0,2	6
Perizonální pruh, počet řad (p)	5	5	–	–	5	5	11
Adorální membrány, počet (p)	29,4	28,5	2,2	7,4	27	33	10
Somatické kinety, počet (p)	29,2	28,5	1,9	6,7	27	32	6
Falešné kinety, maximální počet (p)*	>35;<54						9

Charakteristiky značené (p) jsou měřeny na buňkách barvených protargolem. SD je směrodatná odchylka. CV je variační koeficient. Délky jsou uvedeny v μm .

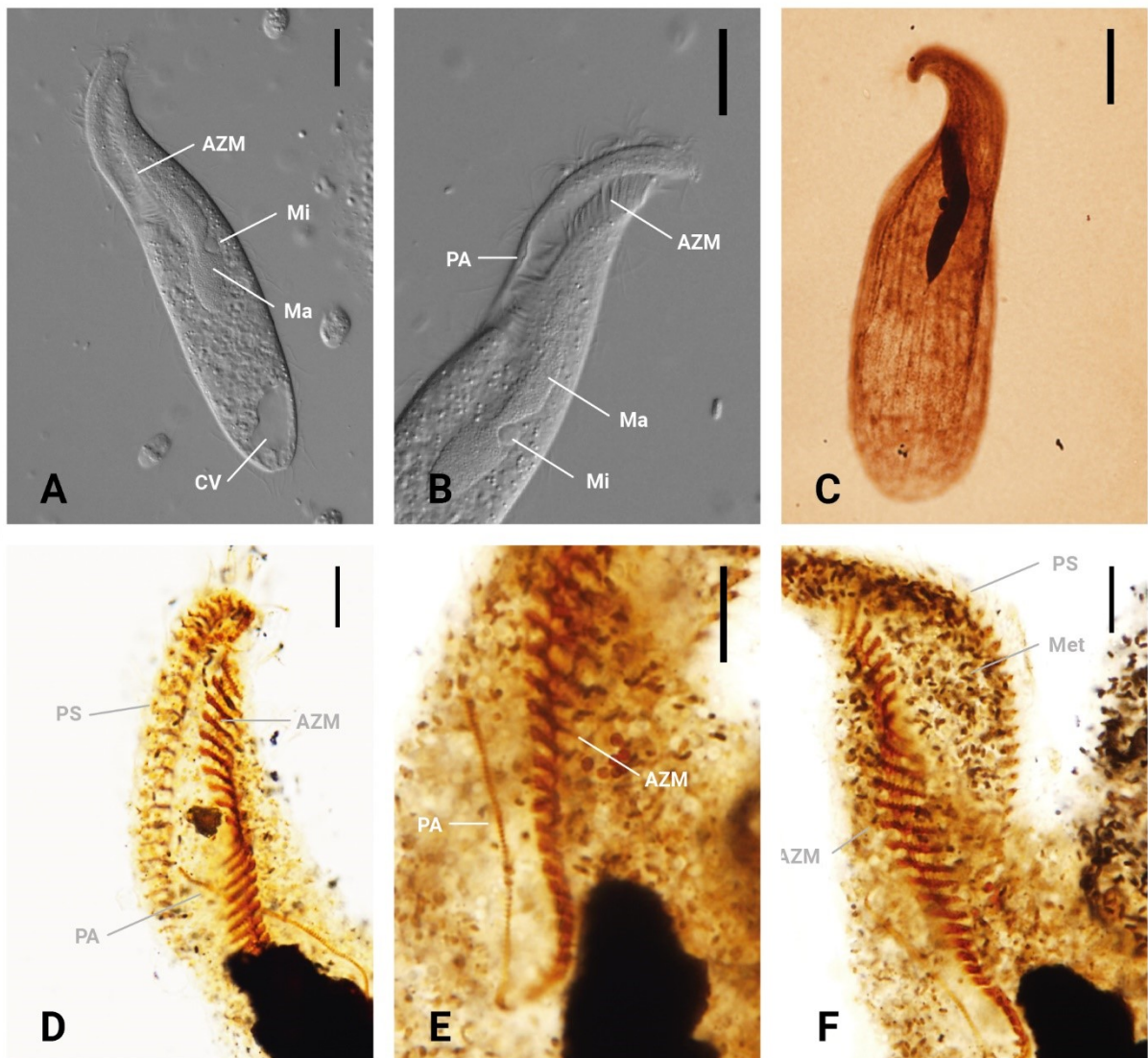
* Obvykle se uvádí počet, jelikož ale vzhledem k výrazné torzi buněk nelze skoro nikdy vidět celý perizonální pruh, uvádím jen interval minimálního a maximálního počtu odhalených falešných kinet. Považuji to za relevantnější údaj než průměr z napočítaných viditelných falešných kinet i v případech, kdy zjevně není celý perizonální pruh viditelný.



Obr. 15 Metopidae sp. C1. Izolát MEDI3L (A–F). A, D–F (protargol), B, C (DIC). C – kortikální granula izolátu MEDI3L. AZM = zóna adorálních membranel, PA = parorální membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, FV = potravní vakuola, SK = somatické kinety, Cyt = cytofarynx. Škály: 20 μm (B), 10 μm (A, C–I).



Obr. 16 *Metopidae* sp. C1., izolát LERMA 4 (SEM). C – šípky značí parorální membránu, D – detail vrás na povrchu buňky, E – šípka značí dikinetidu perizonálního pruhu, F – detail adorálních membranel. Škály: 10 µm (B), 5 µm (C).



Obr. 17 Metopidae sp. C1., izolát LERMA 4. A–C (DIC), D–F (uhlíčitán stříbrný). C – příklad nekvalitního barvení bez viditelných bazálních tělísek. AZM = zóna adorálních membranel, PA = parorální membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, CV = kontraktilní vakuola, Met = nejspíše metanogenní symbionti. Škály: 20 μm (A–C), 10 μm (D–F).

4.6 Nově objevené linie blízce příbuzné druhu *Metopus es*

Vedle izolátů patřících do skupiny IAC jsem při sběru narazil i na další zajímavé metopidy (obr. 18). Z nich jsem se rozhodl zařadit do této práce ještě nově objevené nejbližší příbuzné druhu *Metopus es*, který doposud působil jako solitér. Pracovně jsem linie nazval S1 a S2 a skupinu tvořící s *M. es* jako linii S. Tři izoláty, ROMLOX, KARBA a KUPINOVO, se daří držet ve velmi abundantních kulturách. Jiný pracovní název pro izoláty KARBA a ROMLOX je „lazy metopid“. Vykazují totiž pro metopidy neobvykle líný způsob života. Při hojnosti bakterií jednoduše „leží“ mezi potravou a pohybují se jen velmi zvolna. Dokáží se ovšem morfologicky transformovat z „líné“ do „aktivní“ formy a pohybovat se jako standardní metopid. Morfologická variabilita je známá jak u metopidů v rámci životního cyklu (Esteban et al. 1995), tak u sesterské skupiny metopidů, tedy tropidoatraktidů, kde s životním cyklem souviset nemusí (Rotterová et al. 2018). V případě mých izolátů jde spíše o čistě potravní strategii, neboť po přenesení buněk do čistého média dojde k jejich aktivizaci a změně tvaru.

Linie S1

KARBA , ROMLOX

Středně velký, ale robustní metopid o délce asi 90 μm a šířce až 40 μm u „líné“ formy, nebo 30 μm u „aktivní“ formy. Makronukleus je oválný až ledvinovitý s přiléhajícím mikronukleem, podobně jako u druhu *Metopus es*. Tvar buňky je ovšem od *M. es* výrazně odlišný.

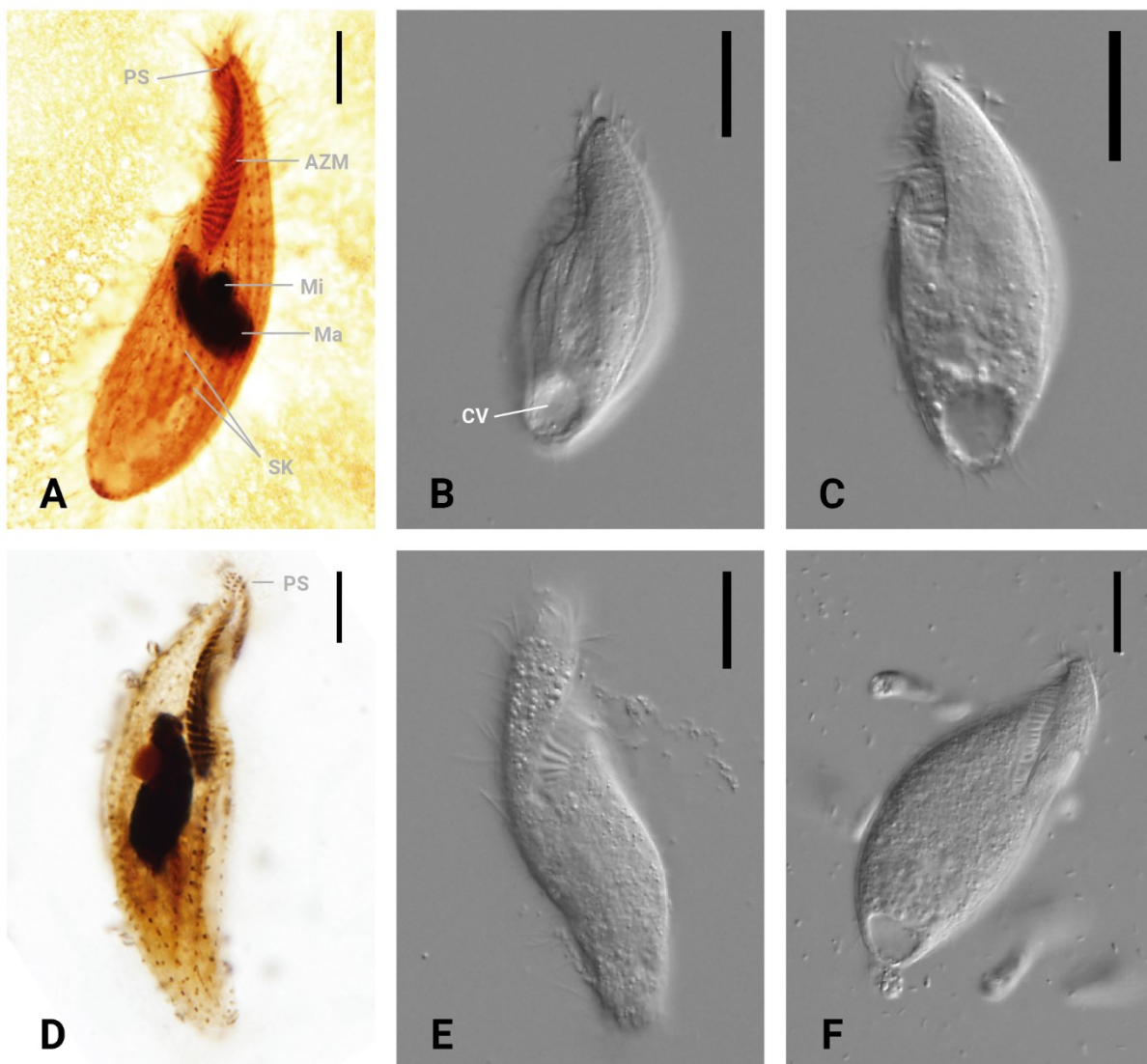
Linie S2

KUPINOVO, SCHWARZSEE NB

Velký metopid tvarově podobný typovému druhu *Metopus es* o délce asi 125 μm a šířce okolo 30 μm .

MEDNIK3G

Podářilo se nalézt pouze jedinou buňku v čerstvém vzorku. Šlo o robustního válcovitého metopida přesahujícího délkou 100 μm se zlatohnědou barvou. Bohužel se nepodařilo získat žádná vizuální data.



Obr. 18 Linie S. Izolát ROMLOX (A–C), KARBAI (D), KUPINOVO (E, F). A, D (protargol), ostatní (DIC). AZM = zóna adorálních membranel, PA = parorální membrána, PS = perizonální pruh, Mi = mikronukleus, Ma = makronukleus, SK = somatické kinety, CV = kontraktilní vakuola. Škály: 20 μm (B, C, E, F), 10 μm (A, D).

5 Diskuze

5.1 Nově nalezená diverzita a otázka odhadování reálné diverzity

Rozsah nově nalezené diverzity v rámci skupiny IAC je překvapivý hned z několika pohledů. Metopidům byla historicky věnována značná pozornost a bylo popsáno nebo reportováno mnoho morfologických druhů. Malých metopidů, jako jsou ti z mé linie B, není však známých mnoho, a ještě jsou většinou přiřazování k jedinému druhu, *Metopus minor* (Kahl 1927, 1932; Foissner 1980; Vuxanovici 1962; Foissner et al. 2002; Çapar 2007). Mořská diverzita pak byla až na výjimky a (zřejmě) chybné determinace úplně opomíjena (Esteban & Finely 2003, 2004). Přestože jsem byl v posledním roce z vnějších příčin donucen omezit sampling jen na Českou republiku, počet nových unikátních izolátů stále konstantně přibýval a přibývá. Přestože se někteří autoři snažili na základě svých rozsáhlých znalostí o známé diverzitě odhadovat tu neznámou (Foissner 2006), jde vždycky víceméně o výstřel naslepo. Zejména pokud jde o půdní metopidy, jejichž diverzita je ve vodních vzorcích nejspíš značně podreprezentována vzhledem k jejich očekávanému dlouhodobému přežívání v cystách. Zároveň lze spekulovat i o možnosti potravní nebo environmentální specifičnosti neznámých linií. Jakýkoli pokus o kvalifikovaný odhad proto považujeme za příliš naivní až do chvíle, kdy bude zpracována rozsáhlejší fylogenetická analýza na základě environmentálních dat z nejběžnějších habitatů anaerobních nálevníků.

Přinejmenším stejně překvapivý je i nálezy diverzity v rámci linie S. Až dosud nebyly známy žádné sekvence blízké příbuzné druhu *Metopus es*, a ten přes intenzivní výzkum (Bourland et al. 2017a) představoval ve fylogenetických analýzách jednodruhovou větev (viz např. obr. 3). Zajímavý je tento nálezy i z pohledu budoucí revize rodu *Metopus*. Vzhledem ke způsobu, jakým byl taxonomy ustaven (viz oddíl Historie rodu *Metopus*), je nyní pod náporu genetických dat v úpadku, když jsou jeho jednotliví zástupci řazeni do vlastních rodů. Nově nalezené linie S1 a S2 tak mohou v budoucnu představovat konečně solidně molekulárně podložené druhy rodu *Metopus*. Úspěšné výsledky cíleného samplingu skupiny IAC pak dávají jistou naději na odhalení ještě bohatší diverzity linie S.

5.2 Dříve morfologicky popsaní pravděpodobní zástupci skupiny IAC

V této části jde o pouhé odhady na základě morfologických znaků, které se ukázaly v rámci zkoumání získaných izolátů jako typické.

Metopus hasei (Sondheim, 1929) sensu Çapar 2007

Metopus hasei (Sondheim, 1929) sensu Vďačný 2007

Metopus hasei (Sondheim, 1929) sensu Dragesco & Dragesco-Kernéis 1986

U metopidů publikovaných jako *Metopus hasei* jde většinou podle základních znaků o velmi pravděpodobné zástupce skupiny IAC, není ovšem vůbec jisté, o kolik různých druhů vlastně jde.

V tomto případě jde nejspíš o organizmy příbuzné asambláži HY.

Metopus minor (Kahl, 1932) sensu Çapar 2007

Metopus minimus (Kahl, 1935) sensu Vuxanovici 1962

Kvůli výrazným kaudálním ciliím a drobným rozměrům by se opět mohlo jednat o zástupce skupiny IAC. Nejspíše by mohlo jít o linii příbuznou linii B.

Metopus latusculisetus Tucolesco, 1962

Metopus fusus Vuxanovici, 1962

U dvou druhů ztotožněných v Esteban et al. (1995) s druhem *Metopus hasei* Sondheim, 1929 se může snadno jednat o zástupce skupiny IAC. *M. fusus* se však vzhledem k drobným rozměrům spíše podobá linii B. *M. latusculisetus* a mohl by podle naznačené torze preorálního domu a kaudálních cilií patřit k asambláži HY.

Metopus inversus (Jankovskij, 1964) Foissner & Agatha, 1999

M. inversus zřetelně připomíná druh *M. yantaiensis* ve skoro všech charakteristikách. Dá se proto očekávat, že to bude příbuzný druh v rámci asambláže HY.

Metopus magnus Vďačný & Foissner, 2017a

M. magnus se jeví výrazně srpovitým mohutným preorálním dómem, „céčkovým“ typem jaderného aparátu i hlubokou rýhou kryjící adorální membranely (viz popis Metopidae sp. C1) jako velmi nadějný kandidát pro linii C.

5.3 Fylogenetická analýza IAC, gen pro 18S rRNA a jeho limity

Fylogenetická analýza založená na jediném genu (genu pro 18S rRNA) sice pomohla v odhalení dosud neznámé diverzity IAC metopidů, ale samotné fylogenetické vztahy uvnitř skupiny IAC dokáže jen naznačit. Vzhledem k malému počtu známých sekvencí v rámci skupiny IAC se dalo očekávat, že nově nalezené linie by mohly projasnit poměrně spletené vzájemné vztahy uvnitř skupiny. Se zvyšujícím se počtem sekvencí se ovšem, oproti očekáváním spojeným s lepším taxon samplingem, situace dokonce dále komplikuje. Skupina IAC ztrácí někdy robustní podporu, nikoli v případě fylogenetické analýzy v této práci, na jejímž základě byla definována (Bourland et al. 2018b). Tento stav je zřejmě zapříčiněn blízkou příbuzností a relativně nízkou genetickou diverzitou v rámci použitého genu. Na vině je tedy nedostatečná citlivost a pro následné analýzy bude nutné přidat další markery. Identifikované linie A, B, C se na druhou stranu zdají být velmi solidně podpořené a vzhledem k morfologickým charakteristikám uvedeným v přehledu izolátů bychom je mohli chápat jako jednotlivé rody. Obdobně je tomu i u izolátu SIERRA.

Vedle omezených možností jednogenu analýzy je tu ještě problém kvality publikovaných molekulárních dat. Během práce se sekvencemi jsem narazil na podezřele vyhlížející jednonukleotidové záměny nebo indely ve velmi konzervovaných úsecích. Zvláště v případě více klonů, kde lze sekvence srovnat (Vďačný et al. 2019), by se dalo spekulovat, že by mohly být způsobeny chybami při PCR nebo chybném složení sekvencí z jednotlivých sekvenačních běhů (Omar et al. 2017, Silva-Neto 2016). Vzhledem k nízké variabilitě v genu pro 18S rRNA v rámci skupiny IAC mají pak takové potenciální omyly výrazný vliv na topologii stromu. Nemůžeme tedy s dostatečnou mírou jistoty vědět, zda jde třeba u druhů *Atopospira galeata* nebo *Metopus laminarius* (ve smyslu publikovaných sekvencí ve Vďačný et al. 2019, resp. Bourland & Wendell 2014; Bourland et al. 2014) o variabilitu, samostatné linie nebo jen o chyby v sekvenci. Jisté pochybnosti budí i sekvence společně publikované jako *Metopus yantaiensis* a *M. hasei* (Omar et al. 2017). Rozdíl udávaný v morfologii (pouhá mikrofotografie u *M. hasei*) je velmi kontrastní s minimem rozdílů v sekvencích. I v mé analýze je pozice *M. hasei* sensu Omar et al. (2017) zvláštní. Stále je však třeba připustit i možnost morfologické variability. Otázkou zůstává, zda vnitrodruhové, anebo mezidruhové. Výše zmíněné neduhy se týkají i jinak mimořádně cenné sekvence druhu *Parametopidium circumlabens* (Silva-Neto et al. 2016). Zde je naléhavá potřeba nových molekulárních dat pro celou potenciální endosymbiotickou skupinu.

5.4 Obtíže s barvením metopidů ze skupiny IAC

Během pokusů o barvení studovaných izolátů různými technikami se potvrdily zprávy o suboptimálních či vyloženě nedostatečných výsledcích známé z literatury (Dragesco & Dragesco-Kernéis 1986; Foissner et al. 2002). Při barvení protargolem se setkáváme hned se dvěma základními problémy. Prvním je velmi časté obarvení kortikálních granul, které do značné míry znemožňuje rozpoznat somatické kinety nebo i další struktury buňky. Tento problém je přímo zmíněn nebo je alespoň patrný na publikovaných mikrofotografiích u řady autorů (např. Dragesco & Dragesco-Kernéis 1986; Foissner et al. 2002). Po mnoha pokusech se tento problém podařilo vyřešit změnou fixáže, a to na Bouinův roztok místo standardního 4% formalínu. Výsledky jsou pro většinu barvených izolátů výrazně lepší. Na druhou stranu se buňky při tomto způsobu fixace stávají lepkavými, a je proto stěžejní jejich předchozí důkladné omytí od bakterií z média a dalších nečistot. Druhý problém spočívá naopak v nedostatečném barvení zejména orální ciliatury zejména u izolátů z linie C. Částečné řešení se našlo vlastně náhodou při snaze využít jiný typ barvení pomocí uhličitanu stříbrného (Ag_2CO_3). Obvykle takový pokus končí nezdarem a přílišným obarvením kortikálních granul, tj. černými buňkami, protože je potřeba pro tuto techniku fixovat buňky 4% formalínem. Nicméně během fixace došlo k perforaci nebo i přelomení buněk, což mělo za následek jen obarvené fragmenty, anteriorní a posteriorní části nálevníků. Díky tomu se ovšem povedlo docílit obarvené orální ciliatury v kvalitě, která dosud nebyla publikována. Dovolím si spekulovat, že právě tyto nezdary při snaze o barvení zástupců „druhu“ z okruhu *M. laminarius* měly za následek to, že tento druh dosud není popsán podle soudobých morfologických standardů. Zároveň se zdá, že je problém při barvení tohoto druhu zapříčiněn nějakou vrstvou neznámého charakteru na povrchu buňky, která brání dostatečnému průniku sloučenin stříbra do buňky. Zvláštní povrch patrný ze snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu je patrný v popisu druhu *Metopidae* sp. C1 v této práci (viz obr. 16f A, D). K provedení dostačující morfologické a morfometrické analýzy nakonec posloužily buňky izolátu MEDI3L velmi brzy po tom, co byly izolovány z původního vzorku. Na jedné straně možná pomohl kyslíkový stres, při němž se buňky naplní průhlednými vakuolami a nafouknou se, takže jsou pak struktury na povrchu lépe patrné. Na druhé straně je možné (i když možná málo pravděpodobné), že změny povrchu a obtížné barvení souvisí s kultivací nebo se specifickými vlastnostmi prostředí ve vzorku či médiu.

5.5 Možnosti využití „direct PCR“

Metoda přímého použití buněk pro PCR bez předchozí izolace DNA (viz oddíl Materiály a metody) se ukázala v případě metopidů velmi efektivní. Pro kvalitní výsledek direct PCR u metopidů je nutné používat jen přiměřené množství buněk. Při větším množství (zhruba 8 a více) se mi amplifikační reakce nezdařila. U buněk z mořských a brakických vzorků a médií je třeba nejprve buňky pečlivě omýt v destilované vodě (viz oddíl Materiály a metody). Bez omytí nebyla procedura úspěšná. Chromatogramy získané sekvenací jsou velmi čisté a mají spolehlivý silný signál. Nutno ovšem podotknout, že nejde o originální řešení v obecném slova smyslu. Jde o poměrně přirozený postup, který využívá řada badatelů (např. Lynn & Pinheiro 2009; Kim et al. 2010), ačkoli v rámci mého výzkumu vznikl spontánně bez konzultace s literaturou čistě na základě předpokladu, že makronukleus metopidů obsahuje velké množství DNA (D. Méndez-Sánchez, osobní komunikace).

V mém případě bylo potřeba verifikovat identitu izolátů z udržovaných dlouhodobých kultur. Kultury mohou obsahovat nedetekovanou druhovou diverzitu, která se projeví až v průběhu času, nebo může dojít ke kontaminaci při transferu do nového média. Direct PCR umožňuje rychlé ověření s velmi kvalitním a silným signálem. Další užitečnou aplikací je rutinní determinace druhů metopidů ze vzorků využitelná i pro ekologické studie namísto spoléhání na vizuální určování druhů.

5.6 Úskalí a budoucnost morfologie v taxonomii metopidů

Pokud jsou pro taxonomii používána výhradně morfologická data, vystavujeme se problému, že si nikdy nemůžeme být tak docela jistí, že se skutečně díváme na tentýž organismus, který byl popsán. Tato fundamentální nejistota je pochopitelně inherentní jakémukoli srovnání, protože výčet znaků je vždy konečný. Nemůžeme tudíž vědět, jestli hned v tom dalším, který jsme nezohlednili, se dané organismy neliší. Zároveň je zřejmé, že s rostoucím počtem znaků roste i jistota našeho rozlišení.

Taxonomové se v případě metopidů dlouho spoléhali jen na několik znaků a, zejména, na určitý „gestalt“, tedy morfologickou charakteristiku organismu vyjádřenou jednoduchou kresbou. A některým autorům podobný přístup vydržel až do nedávné doby (srov. např. Esteban et al. 1995; 2000). Tento způsob definování druhu má zásadní vadu. Zatímco se obrázek může zdát zcela výstižný pro autora, je výrazně mnohoznačnější pro interpreta. V rámci historické taxonomie metopidů tak vznikl bohatý soubor kreseb, který se často traduje až do současnosti napříč jednotlivými publikacemi a předkládá se jako doklad identity několika organismů.

Různá, ze současného pohledu chybná přiřazení by šlo jednoduše označit jako chybné identifikace, které budou později napraveny. Otázkou je, na základě čeho tak můžeme soudit. Třeba proto, že najdeme organismus, který kresbě a popisu odpovídá více než ten, který se mu zdál nejlépe

odpovídat až této chvíli. Potíž je, že z toho mimo jiné plyne, že ani naše identifikace není v kontextu možných budoucích nálezů jistější, protože hned další objevený organismus může ještě přesněji odpovídat původnímu popisu. A nahlédnuto z opačné strany, jak si můžeme být jisti, že autor původní kresby a popisu zachytil svůj objekt dostatečně věrně? Bez alespoň rámcové představy o diverzitě metopidů bude vždy chybět kontext, ve kterém budou naše srovnání dávat alespoň elementární jistotu. Historie rodu *Metopus* je také historií omylů a pro metopidy ze skupiny IAC to naneštěstí platí dvojnásob. A jestli historie rodu *Metopus* něco ukazuje úplně jasně, je to skutečnost, že kvalifikované představy o diverzitě nelze dosáhnout výhradně morfologickými metodami. Níže uvádím tři příklady, které ilustrují spletité osudy tří pro skupinu IAC stěžejních a často se v publikacích vyskytujících druhů.

5.6.1 Případ *Metopus laminarius* aneb záměna

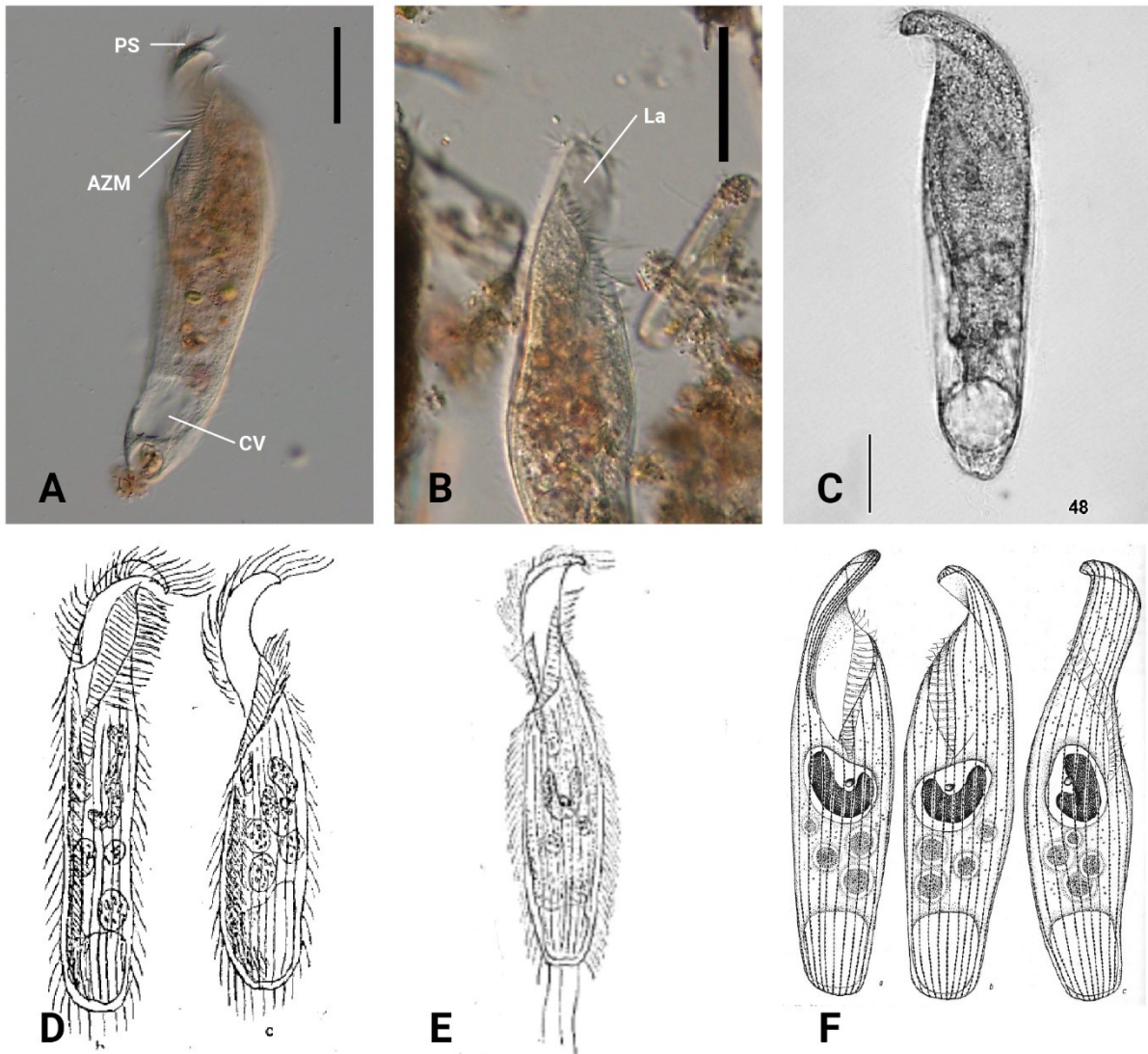
Metopus laminarius byl poprvé popsán A. Kahlem v roce 1927 a následně stejným autorem znovu popsán (1932). Následně druh znovu popsal A. Jankovskij (1964). Existují tedy jen tři poměrně stručné morfologické popisy a několik kreseb tohoto druhu. Od té doby se ovšem druh *M. laminarius* etabloval jako „trávaný“ druh. Tedy druh, který sice moderními metodami nikdo nepotvrdil, ale který se bere jako daný. Odkazuje se na něj v řadě zejména ekologických studií, ať v nich byla determinace provedena morfologicky pomocí literatury nebo nepopsaným způsobem (např. Mori et al. 1996; Esteban & Finlay 2003, 2004), nebo pomocí sekvence genu pro 18S rRNA (Bourland et al. 2014; Yamashiro 2016; Vďačný et al. 2019). V některých případech autoři dokládají svou identifikaci obrazově (Bourland et al. 2014; Yamashiro 2016). Nejde nyní o vyčerpávající výčet studií, jen o ilustraci, že „druh“ *M. laminarius* je hojně užíván v ekologických či fyziologických studiích. Se značnou pravděpodobností jde však, alespoň ve studiích, které uvádějí fotodokumentaci nebo sekvence, o chybnou determinaci.

Během řešení diplomového projektu se mi podařilo objevit organismus, který jsem nebyl s to jednoduše na první pohled zařadit k metopidům, izolát SIERRA (obr. 6). Ukázalo se však, že nečekaně přesně odpovídá popisu druhu *Metopus laminarius* u Kahla (1927. 1932) a Jankovského (1964). Jeho fylogenetická pozice se ovšem v mé analýze výrazně neshoduje se sekvencemi publikovanými jako *M. laminarius*, tedy se sekvencemi organismů identifikovaných podle Kahlova či Jankovského popisu jako *M. laminarius* jinými autory (Bourland et al. 2014, Vďačný et al. 2019). Při prvním nálezů jsem získal pouze čtyři buňky, podobně, jako to reportuje Kahl (1927) ve svém originálním popisu. Měl jsem proto velmi málo dat pro srovnávací morfologickou analýzu. Po roce se mi však poštěstilo ve stejné

lokalitě získat výrazně více abundantní vzorek a detailnější fotodokumentace mi umožňuje navrhnout následující závěr.

Kahl (1927) sice neuvádí důvod pro pojmenování „*laminarius*“, zřejmě proto, že mu to přišlo očividné. U zmíněného druhu totiž popisuje v anteriorní části výraznou deskovitou protruzi (obr 19 D). Tu pak později popisuje jako plastickou, tedy nikoli rigidní. Podstatné také je, že zóna adorálních membranel na všech vyobrazeních zdaleka nedosahuje anteriorního konce buňky (obr. 19 D, E). Tato struktura způsobuje, že má buňka na metopida velmi neobvyklý tvar a specifický pohyb při plavání. I Jankovskij (1964) se pozastavuje nad tím, jak jsou dané struktury neobvyklé (srov. obr. 19 F), a v rodu *Metopus* tento druh ponechává jen provizorně, než budou k dispozici lepší data. Druhým znakem je velikost, která přesahuje 200 nebo i 250 μm , což je u metopidů hodně (Kahl 1932). (Jediný další mně známý metopid těchto rozměrů je *M. palaeoformides* Vďačný & Foissner, 2017a, který se však od zmíněných popisů *M. laminarius* morfologicky velmi liší.) Makronukleus je pak červovitý a zkroucený. A zejména (téměř) vždy obsahuje trávicí vakuoly s rhodobakteriemi, které dávají buňce vínovou barvu (Kahl 1932; Jankovskij 1964; srov. zejména obr. 6 D, G a H). Jankovskij (1964) navíc zmiňuje ještě jeden zvláštní znak, totiž výrazné krystaly v cytoplazmě (srov. obr. 4 H). V odhadu počtu adorálních membranel se Kahl a Jankovskij liší, 12 vs. 20. To se dá snadno pochopit vzhledem k tomu, že ani jeden neměl k dispozici barvené preparáty (Kahl 1927, 1932; Jankovskij 1964). Existuje dokonce publikovaná fotografie organismu pod názvem *M. laminarius* nejspíš odpovídajícího Kahlově a Jankovského popisu a izolátu SIERRA (Kreutz & Foissner 2006).

Navzdory tomu, že Kahl i Jankovskij poukazovali na zvláštnosti jimi popisovaného druhu, objevují se v literatuře zcela odlišné interpretace (Esteban & Finlay 2003, 2004; Bourland et al. 2014). Někteří autoři dokonce situovali rovnou domnělý druh *M. laminarius* do hypersalinního prostředí (Esteban & Finlay 2003, 2004), což zřejmě znamená, že jde spíše o metopida patřícího do linie A, kterou jsem představil výše. Ten je jedinou dosud odhalenou „mořskou“ či „halofilní/halotolerantní“ linií v rámci skupiny IAC. Druhá skupina autorů podle všeho zaměnila druh *M. laminarius* za druh popsany v této studii na základě izolátů MEDI3L a LERMA4, případně za blízce příbuznou linii (Bourland et al. 2014; Vďačný et al. 2019). Už po letmém přečtení popisu izolátu MEDI3L, je zjevné, že se tento „*laminarius*“ v podstatných rysech liší od originálního popisu. Vzhledem k autoritě autorů pak tento omyl přejali další buď explicitně (Rotterová 2015; Yamashiro 2016) nebo implicitně, když tvrdí, že je *M. laminarius* podobný *M. hasei*, což nelze říct na základě ničeho jiného než povrchního přehlédnutí fotografií (Omar et al. 2017). Vzhledem k tomu, že se v tomto případě zřejmě zmýlili významní odborníci na taxonomii metopidů, dá se předpokládat, že situace v ekologické literatuře, kde se zpravidla využívá zjednodušené morfologické determinace druhů, bude ještě spletenější, protože často ani nevíme, jakou metodou k determinaci druhů došlo (např. Vogels 1984; Guhl et al. 1996; Mori et al. 1996).



Obr. 19 A – izolát SIERRA (DIC), B – SIERRA (bright field), C – *M. laminarius* z Bourland et al. 2014 (bright field), D – *M. laminarius* podle Kahla (1927), E – *M. laminarius* podle Kahla (1932), D – *M. laminarius* podle Jankovského (1964). PS = perizonální pruh, AZM = zóna adoralních membranel, CV = kontraktilní vakuola, La = „lamina“ charakteristická podle popisů pro druh *M. laminarius*. Škály: 25 μm (C), 50 μm (A, B). A, B vlastní mikrofotografie.

5.6.2 Příklad *Metopus hasei* aneb sběrný taxon

Odlišný, a ještě komplikovanější případ je *Metopus hasei*. Druh traktovaný jako mimořádně morfologicky variabilní a kosmopolitně rozšířený na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy (Foissner & Agatha 1999). Poprvé byl *M. hasei* popsán z Madagaskaru v roce 1929 (Sondheim 1929). Následně byl znovuobjeven v Rakousku W. Foissnerem (1981), reportován opět z Afriky (Dragesco & Dragesco-Kernéis 1986) a konečně detailně popsán na základě několika populací (Foissner & Agatha 1999). Ponechme stranou otázku, na základě čeho se vlastně W. Foissner rozhodl, že jde o stejný druh jako u M. Sondheim (1929). Jak už jsem uvedl dříve, morfologická determinace je zásadně ovlivněná korpusem známé diverzity. Ta ustavuje kontext, v rámci něhož se taxonom rozhoduje a interpretuje příslušné znaky. V samotných starších popisech je obecně velmi málo informací, takže prostor pro interpretaci kresby je značný.

V kanonickém článku z roku 1999 Foissner pokročil ještě o kus dál. Vedle své rakouské populace využil i metopidy nalezené v Namibii, Jihoafrické republice a Venezuele. Morfologii vyžil jen z prvních tří a venezuelská populace je využita jen jako SEM snímek bez morfometrických dat. Z článku je patrné, že morfometrická disparita mezi jednotlivými populacemi je enormní (viz komparační tabulka 5). Ačkoli by to mělo hovořit proti zařazení všech tří populací pod jeden druh, protože determinace druhů je přeci smyslem morfometrických tabulek, autor jen konstatuje vnitrodruhovou variabilitu. Znaky, které se autor rozhodl brát jako relevantní (kvalitativní) převážily ty ostatní (kvantitativní). Takto udaný precedens pak pokračoval dalšími dvěma publikacemi s morfologickými daty (Çapar 2007, Vďačný 2007). Tím byla do již deklarované vnitrodruhové variability přidána další a touto pozitivní zpětnou vazbou by takový, vlastně sběrný taxon mohl růst ad absurdum. Což se bohužel do značné míry stalo, protože se objevují další reportované nálezy doprovázené většinou jen mikrofotografií (He & Choi 2015) nebo i (diskutabilní) sekvencí (Omar et al. 2017), případně jen sekvencí (Vďačný et al. 2019).

V této studii jsem narazil na řadu izolátů, které spadají do assembláže HY. Ty napovídají, že diverzita ukrývající se pod název *M. hasei* bude zřejmě až překvapivě hojná a spleťtá. A i v tomto případě to budou nakonec molekulární data, která nám dají potřebné informace a kontext pro hodnocení morfologických znaků.

Tab. 5 Publikované morfotypy druhu *Metopus hasei* a jejich základní charakteristiky

Charakteristika	Sondheim 1929	Foissner 1981	Dragesco & Drageso-Kernéis 1986	Foissner & Agatha 1999 (JAR)	Foissner & Agatha 1999 (Namibie)	Çapar 2007	Vďačný 2007
délka (p)	–	57–75	51	92–129	43–89	–	61–74
šířka (p)	–	–	13	14–30	16–29	–	17–20
délka (naživo)	70–90	70–100	80–90	–	–	59–81	80–95
šířka (naživo)	17–24	13–18	–	–	–	17–21	20–30
AZM (počet)	–	17–20	17–20	21–26	15–18	15–17	13–18
SK (počet)	–	10	–	14–16	10–16	10–11	10–13
FK (počet)	–	23–25	–	28–36	20–28	–	–
NA	oválný/íčkový	íčkový	íčkový	–	oválný (?)	oválný (?)	íčkový
CC (délka)	asi v délce buňky	–	30	–	–	–	–

Charakteristiky značené (p) jsou měřeny na buňkách barvených protargolem. Délky jsou uvedeny v μm . AZM = zóna adorálních membranel, SK = somatické kinety, FK = falešné kinety, NA = jaderný aparát, CC = kaudální cilia.

5.6.3 Příklad *Metopus minor* a *Longitaenia gibba*

Obdobnou historii má i další známý druh skupiny IAC, *Metopus minor*. Po Kahlově prvním popisu (1927) přišla redeskripce W. Foissnera (1980) a následně ještě jedna (Foissner et al. 2002). Pro nedostatek materiálu provedená opět ze tří různých populací, z Islandu (morfometrická data), Namibie (kresby) a Keni. Dále pak autoři reportují nález i ve Venezuele bez dalších dat (Foissner et al. 2002). Skla s obarvenými preparáty se podle informace autorů ztratila (Foissner et al. 2002), takže ani revize není možná. Aniž bych zabíhal do podrobností, i v tomto případě jde zjevně o kombinaci více druhů vzhledem k zásadním odlišnostem ve stavbě zóny adorálních membranel na vyobrazeních a v popisu. Autoři synonymizují své izoláty s Kahlovým popisem (1927) a jinými publikovanými popisy (Vuxanovici 1962, Foissner 1980; Foissner et al. 2002). Později přibyl ještě jeden report s morfologickými daty (Çapar 2007), kde se však opět zcela zásadně rozchází počet adorálních membranel (cca 15 vs. cca 6 ve Foissner et al. 2002). Nicméně to nebrání tomu, aby se začal tradovat další kosmopolitní druh. Zjevnou misidentifikací je pak nález Esteban et al. (2000) ve vulkanickém jezeře. Jako v případě *M. hasei* i zde byla nakonec publikována sekvence bez jakýchkoli doplňujících dat (Vďačný et al. 2019). Podobně jako u *M. hasei* se autoři navzdory publikovaným morfometrickým datům soustředili jen na ty znaky, které mají dané izoláty společné. Na rozdíl od výše uvedené diskuze o druhu *M. laminarius* zde bude mnohem složitější celou situaci vyjasnit, pokud se to vůbec kdy podaří.

S případem *M. minor* je i úzce spjat druh *Longitaenia gibba*, jehož morfologie byla recentně velmi pečlivě popsána (Bourland et al. 2020). Je blízce příbuzný skupině IAC. Rod *Longitaenia* tvoří společně se skupinou IAC skupinu LAC opět s velmi robustní podporou (Bourland et al. 2020). Podle morfologie se zdá, pokud si opět dovolíme spekulovat, že Çaparův (2007) *M. minor* by mohla být právě *Longitaenia gibba* (Çapar 2007). Ale jak neustále opakuji, ani sebepodrobnější morfologická data nedávají dostatečnou jistotu bez dalšího kontextu, protože neznáme skutečnou diverzitu těchto metopidů.

5.6.4 Jaké znaky mají smysl?

Radikální závěr by mohl znít tak, zda by nebylo lepší při popisu nových linií nebrat ohled na historické popisy a ponechat si je jako muzejní zajímavosti a kuriozity. Ve světle předchozích případů jsou seznamy historických synonym a kombinací v článcích často jen slohovým cvičením. Ani diferenciální diagnózy pak nesplňují svůj účel, pokud jsou vystavěny na tvrzeních, že se něco podobá či nikoli, aniž by se autor odkazoval na konkrétní popisy druhů, které porovnává. Jak je vidět z uvedených případů pokrývajících velkou část dosud známé diverzity skupiny IAC, taxonomická praxe založená na morfologii možná vytváří spíše chaos než uspořádaný systém. Synonymizace a determinace podle morfologie bude skoro vždy jen zbožným přáním nebo jen slabou hypotézou. Doufám, že se mi alespoň trochu podařilo ilustrovat konfirmační bias vnášený autory. Selektivní výběr znaků podporujících už předem vybrané řešení se neshoduje s vědeckou praxí a pokud se chce taxonomie metopidů povznést nad pouhé dohady, bude muset mnohem více spoléhat na molekulární data. Jak napovídají uvedené případy, bez nich se taxonomové nikdy nedohodnou, resp. jediná možnost shody bude čistě na základě autority příslušných autorů.

V původních popisech z devatenáctého a začátku dvacátého století bylo informací často velmi málo. Přesto se mnozí autoři nezdráhali synonymizovat nebo chápat své nálezy jako konspicické s těmito popisy. Postupně převládla představa lepší systematizace morfometrických dat do tabulky. Takto pojatá tabulka se potom dále rozrůstala o další možné „znaky“. Přičemž krom počtu membranel, kinet apod. jde hlavně o vzdálenosti, a to často velmi obtížně měřitelné. Bud' proto, že jsou příliš krátké (např. vzdálenost od anteriorního konce buňky k anteriornímu konci zóny adorálních membranel) nebo silně závisí na typu fixace a stavu buňky před fixací (např. vzdálenost od anteriorního konce buňky k posteriornímu konci makronukleu). V morfometrických datech jsou tak hned dva typy nejistot. První vyplývá z nemožnosti danou strukturu změřit (např. konec AZM zakrytý silně zbarveným makronukleem nebo nemožnost spočítat falešné kinety perizonálního pruhu kvůli výrazné torzi buňky a jejímu komplikovanému trojdimenzionálnímu tvaru). To může vést a vede ke

zkreslení zejména u délky parorální membrány, např. se to zdá velmi pravděpodobné ve Vďačného studii (2007). Začátek parorální membrány bývá u obtížněji barvitelných zástupců skupiny IAC často špatně viditelný. Variační koeficient (CV) délky parorální membrány je u zmíněného popisu *M. hasei* (Vďačný 2007) 34,5 %, což je už velmi podezřelá hodnota. V pozdější publikaci (Vďačný & Foissner 2017a), kde stejný autor popisuje šest jiných druhů metopidů, je maximální hodnota CV 15,4 % a průměr činí 11,5 %. Ke zkreslení také může dojít u počtu falešných kinet, kde je to zapříčiněno zejména torzí preorálního dómu nebo celé buňky. Druhá nejistota spočívá v odlišné zkušenosti a metodách taxonomů. Metoda barvení i typ fixativa mají vliv na tvar buňky, má ho stav předcházející fixaci, např. vystavení působení kyslíku při omývání buněk nebo množství potravních vakuol. U makronukleu dochází například k rozvolnění, a tím k morfometrickému zvětšení makronukleu (obr. 11 A), ke změnám jeho pozice a obě tyto hodnoty mají vliv na množství výsledků. Celkové počty zpracovávaných buněk pro danou statistiku často nepřekračují 15, jako nutné minimum se bere 10. Je to sice pravděpodobně příliš málo, ale tento úzus vyplývá spíše z obtížnosti nebo nemožnosti získat dostatečný počet buněk u vzácných a málo abundantních metopidů. Takže přesto, že je žádoucí a často uváděný náhodný výběr buněk, z různých důvodů náhodný není. Ke zvyšování počtu měřených atributů s odůvodněním, že se to třeba v budoucnu bude hodit, jsem proto skeptický.

Když se obrátím ke kvalitativním znakům, mohu uvést jako příklad pro tuto práci navrženou typologii jaderného aparátu. Ideální typ se pochopitelně nevyskytuje u všech jedinců ve všech fázích buněčného cyklu. Podle studie morfogeneze druhu *Metopus hasei* (nepodařilo se mi zjistit, o který izolát se jedná) a *M. inversus* (Foissner & Agatha 1999) se zdá, že by se hypoteticky mohla pozice mikro- a makronukleu a tvar makronukleu během buněčného cyklu měnit do té míry, že by metopid vystřídal více typů. Ze statistického hlediska by to ovšem nemělo představovat vážný problém. Jakmile se však vyкроčí mimo skupinu IAC, dá se očekávat, že se jistě najde metopid s jaderným aparátem podobným některému z typů použitých pro skupinu IAC. Podstatným předpokladem pro smysluplné použití morfologických znaků je tak podle mého názoru upřednostnění molekulárních znaků. Jinými slovy, pokud je dán kontext na základě genetických nebo lépe genomických dat, pak má smysl použít morfologické znaky pro definici taxonu. Pokud dva izoláty vykazují shodu genetickou, ale liší se morfologicky, pak bych doporučil zastávat konzervativní přístup a nevytvářet dva taxony, dokud nebude více molekulárních dat. Tento konzervatismus mi přijde opodstatněný, na rozdíl od konzervatismu čistě morfologického, který vedl k ustavení výše probraných druhů *Metopus hasei* a *M. minor*. Otázka tedy nezní, jaké znaky mají smysl, nýbrž kdy má daný znak smysl.

5.7 Ekologie a habitaty

Rozšíření metopidů ze skupiny IAC se zdá být kosmopolitní a víceméně konzistentní s ubikvitní teorií rozšíření mikroorganismů (Fenchel & Finlay 2004). Opakovaně to bylo dokládáno na druzích *Metopus hasei* nebo *M. minor* (např. Foissner & Agatha 1999; Foissner et al. 2002; Vďačný et al. 2019). Jak bylo ovšem ukázáno výše, důvěryhodnost těchto spíše „sběrných“ druhů je diskutabilní. Dá se tedy souhlasit s rozšířením metopidů skupiny IAC všude mimo Antarktidu, nicméně už ne s tím, že jsou po všech kontinentech rozšířeny konkrétní druhy. Navíc byla v nedávné době popsána řada nových morfologických druhů z Austrálie (Vďačný & Foissner 2017a, b). To jako by naopak hovořilo pro určitou biogeografii skupiny IAC. Je zajímavé, že autoři zmíněných popisů nových druhů z Austrálie následně zřejmě ze stejných vzorků izolovali DNA, kterou však přiřadili k dříve popsaným druhům (*M. hasei*, *M. minor*) a publikovali v jiné studii (Vďačný et al. 2019).

Vzhledem ke složité situaci spojené s globální pandemií onemocnění COVID-19 nebylo snadné pro potřeby této práce získávat vzorky z jiných kontinentů. Zkusil jsem tedy řešit problém opačně. V rámci České republiky se podařilo izolovat DNA dvou druhů, jejichž publikované sekvence genu pro 18S rRNA nepocházejí z organismů izolovaných v Evropě. Je to *Atopospira galeata* Kahl, 1927 se známými sekvencemi z USA a Austrálie (Bourland & Wendell 2014, Vďačný et al. 2019). Dále *Metopus laminarius* sensu Bourland et al. 2014, už dříve potvrzen z České republiky J. Rotterovou (2015). Vedle toho se podařilo najít v rámci linie B dvě linie (v jednom případě pravděpodobně náležející stejnému druhu) blízce příbuzné environmentálním sekvencím z Colorada, USA. A za zmínku stojí také téměř identické sekvence izolátů LIPKY11H (ČR) a KENHO1 (Keňa). To všechno jsou indicie pro to, že by představa pro kosmopolitní rozšíření metopidů skupiny IAC mohla být oprávněná. Bude však třeba provést důkladnější sampling z různých kontinentů, jak to udělali autoři Bourland et al. (2017a) v případě druhu *Metopus es*.

Zajímavým zjištěním je blízká příbuznost tří sekvencí analyzovaných izolátů se třemi environmentálními sekvencemi z jedné lokality, Rifle (Colorado, USA) (Holmes et al. 2013). Tyto environmentální vzorky pochází ze záplavové zóny řeky Colorado z oblasti bývalého uranového a kobaltového dolu. Dvě z těchto sekvencí byly příbuzné mé linii B, což dává smysl už proto, že mé izoláty jsou ze vzorků půdy ze břehu sladkovodních ploch. Překvapivá je přítomnost sekvence HF568850 v linii A, tedy brakicko-mořské. Je blízce příbuzná izolátu KORISSION ze slaného jezera z ostrova Korfu. Vysvětlení se nabízí tři. Buď jsou podmínky v lokalitě u řeky Colorado kvůli minerálnímu složení půdy či podloží vhodné pro halofilní druhy, nebo jsou alespoň někteří zástupci z linie A tolerantní ke slané i sladké vodě. Poslední možností je, že izolát KORISSION nebyl ve

skutečnosti halofilní, ale jen dočasně halotolerantní, protože se ho nepodařilo udržet. Tyto hypotézy budou muset být ověřeny experimentálně a nejlépe i novým samplingem linie A.

Vzhledem k tomu, že i naše nově nalezené „druhy“ a také dříve či recentně publikované molekulárně či jen morfologicky popsané druhy metopidů z linie IAC (Bourland & Wendell 2014, Bourland et al. 2018b; Foissner & Agatha 1999; Omar et al. 2017; Vďačný & Foissner 2017a, 2019) pocházejí zejména z půdních a sedimentárních vzorků, dá se důvodně očekávat, že právě výzkum těchto typů vzorků přinese objev dalších dosud neznámých zástupců. To, že metopidi ze skupiny IAC byli izolováni ze sladkovodních, brakických, mořských sedimentů i z půdy, značí, že jsou schopni prosperovat v širokém spektru prostředí, což může souviset i s jejich schopností adaptace a s úspěšným přechodem z života v sedimentu do střev živočichů. Bohužel, vzhledem k tomu, že podstatná část jejich diverzity je dosud zjevně nepopsána, nemohla zatím vyvstat ani tato otázka. Proto je nutné podrobné a molekulárně podložené poznání jejich diverzity jako předpokladu pro další výzkum.

6 Závěr

V rámci této práce se podařilo zmapovat dosud neznámou diverzitu metopidů skupiny IAC. Provedl jsem základní fylogenetickou analýzu na základě genu pro 18S rRNA a odhalil tři dobře podpořené linie, které by mohly být novými rody v rámci čeledi Metopidae a řadu dalších zajímavých linií. Provedl jsem i stručnou charakteristiku jednotlivých linií po morfologické stránce a provedl detailní popis jedné, v rámci studia metopidů důležité, linie sekvenčně totožné s druhem *Metopus laminarius* sensu Bourland et al. (2014). Izoláty se v kulturách daří trvale kultivovat a navrhl jsem i způsob, jak pomocí archivu vzorků uchovávat metopidy i v podobě cyst, příp. odhalovat ze starých vzorků dříve neprojevenou diverzitu. Současně jsem se pokusil rozplést některé komplikované případy již popsaných druhů ze skupiny IAC. I to by mělo přispět k umenšení taxonomického chaosu v rámci této skupiny. Zároveň jsem se pokusil vyvodit z těchto případů obecnější závěry a doporučení pro další taxonomickou práci s metopidy.

Jsem přesvědčen, že se podařilo splnit všechny vytčené cíle a připravit tak půdu pro další výzkum. Všechny praktické i teoretické části této práce jsou totiž nezbytným předpokladem pro další studium diverzity metopidů skupiny IAC modernějšími, fylogenomickými metodami, studium vztahu volně žijících a endosymbiotických skupin a samotného přechodu na endosymbiotický styl života, studium ekologických vztahů v rámci anaerobních habitatů a přechodu či tolerance slaného a sladkého vodního prostředí, studium morfogeneze nálevníků a dalších oblastí.

7 Seznam literatury

- Achmanova, A., Voncken, F., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M. & Hackstein, J. H. P. (1998). A hydrogenosome with a genome. *Nature*, 396:527–528.
- Aesch, E. (2001). Catalogue of the generic names of ciliates (Protozoa, Ciliophora). *Denisia*, 1:1–350.
- Affa'a, F. M. (1991). Observations morphologiques sur deux nyctothères (ciliés hétérotriches) commensaux de batraciens anoures du Québec. *Canadian Journal of Zoology*, 69:2765–2770.
- Affa'a, F. M., Ndong, N., Granosik, L. (1995). Études morphologique et morphométrique des ciliés *Proscicuophora*, commensaux de *Bufo regularis* et *B. maculatus* de la région de Yaoundé (Cameroun) – *Archiv für Protistenkunde*, 145:127–131.
- Albaret, J. L. (1970). Observations sur les nyctothères des genres *Nyctotherus* Leidy et *Metanyctotherus* n. gen., ciliés hétérotriches parasites de myriapodes africains. *Protistologica*, 6(2):225-239.
- Albaret, J. L. (1975). Etude systématique et cytologique sur les ciliés hétérotriches endocommensaux. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle: Zoologie*, 89:1–114.
- Amrein, Y. U. (1952). A new species of *Nyctotherus* (*N. woodi*) from southern California lizards. *The Journal of Parasitology*, 38(3):266–270.
- Beinart, R. A., Rotterová, J., Čepička, I., Gast, R. J., & Edgcomb, V. P. (2018). The genome of an endosymbiotic methanogen is very similar to those of its free-living relatives. *Environmental Microbiology*, 20:2538–2551.
- Biggar, R. B., & Wenrich, D. H. (1932). Studies on ciliates from Bermuda sea urchins. *The Journal of Parasitology*, 18(4): 252-257.
- Bourland, W. A., & Wendell, L. (2014). Redescription of *Atopospira galeata* (Kahl, 1927) nov. comb. and *A. violacea* (Kahl, 1926) nov. comb. with redefinition of *Atopospira* Jankowski, 1964 nov. stat. and *Brachonella* Jankowski, 1964 (Ciliophora, Armophorida). *European Journal of Protistology*, 50:356–372.
- Bourland, W. A., Wendell, L., & Hampikian, G. (2014). Morphologic and molecular description of *Metopus fuscus* Kahl from North America and new rDNA sequences from seven metopids (Armophorea, Metopidae). *European Journal of Protistology*, 50:213–230.
- Bourland, W. A., Rotterová, J., & Čepička, I. (2017a). Redescription and molecular phylogeny of the type species for two main metopid genera, *Metopus es* (Müller, 1776) Lauterborn, 1916 and *Brachonella contorta* (Levander, 1894) Jankowski, 1964 (Metopida, Ciliophora), based on broad geographic sampling. *European Journal of Protistology*, 59:133–154.
- Bourland, W. A., Rotterová, J., & Čepička, I. (2017b). Morphologic and molecular characterization of seven species of the remarkably diverse and widely distributed metopid genus *Urostomides* Jankowski, 1964 (Armophorea, Ciliophora). *European Journal of Protistology*, 61:194–232.
- Bourland, W. A., Rotterová, J., & Čepička, I. (2018a). Morphologic and molecular characterization of *Brachonella pulchra* (Kahl, 1927) comb. nov. (Armophorea, Ciliophora) with comments on cyst structure and formation. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 68:3052–3065.
- Bourland, W. A., Rotterová, I., Luo, X., & Čepička, I. (2018b). The little-known freshwater metopid ciliate, *Idiometopus turbo* (Dragesco and Dragesco-Kernéis, 1986) nov. gen., nov. comb., originally discovered in Africa, found on the Micronesian island of Guam. *Protist*, 169:494–506.

- Bourland, W. A., Rotterová, J., & Čepička, I. (2020). Description of three new genera of Metopidae (Metopida, Ciliophora): *Pileometopus* gen. nov., *Castula* gen. nov., and *Longitaenia* gen. nov., with notes on the phylogeny and cryptic Diversity of metopid ciliates. *Protist*, 171(3):125740.
- Çapar, S. (2007). Morphology and morphometrics of two anaerobic ciliates *Metopus minor* (Kahl, 1927) and *Metopus hasei* (Sondheim, 1929) from Göksu Delta with ecological notes. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 35(1):19-15.
- Claparède, E. & Lachmann, J. (1857–1858). Etudes sur les infusoires et les rhizopodes. *Mémoires de l'Institut National Genevois*, 5–6:1–482.
- Daday, E. (1905). *Nyctotherus piscicola* n. sp., ein neuer Fischendoparasit aus Südamerika. *Zoologischer Anzeiger*, 29:233–238.
- Dragesco, J., & Dragesco-Kernéis, A. (1986). Ciliés libres del'Afrique intertropicale. *Faune Tropicale*, 26:1–559.
- Elwood, H. J., Olsen, G. J., & Sogin, M. L. (1985). The small-subunit ribosomal RNA gene sequences from the Hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. *Molecular Biology and Evolution*, 2:399–410.
- Entz, G. (1888). About three parasitic animals. *Bulletin of the Medical-Natural Sciences Department of the Transylvanian Museum-Association*, 10(3):261–270. (maďarsky)
- Esteban, G. F., Fenchel, T., & Finlay, B. J. (1995). Diversity of free-living morphospecies in the ciliate genus *Metopus*. *Archiv für Protistenkunde*, 146:137–164.
- Esteban, G. F., Finlay, B. J., Olmo, J. L., & Tyler P. A. (2000). Ciliated protozoa from a volcanic crater-lake in Victoria, Australia. *Journal of Natural History*, 34(2):159–189.
- Esteban, G. F., & Finlay, B. J. (2003). Cryptic freshwater ciliates in a hypersaline lagoon. *Protist*, 154(3-4):411–418.
- Esteban, G. F., & Finlay, B. J. (2004). Marine ciliates (protozoa) in central Spain. *Ophelia*, 58(1):12–22.
- Fenchel, T. (2014). Protozoa and oxygen. *Acta Protozoologica*. 53:3–12.
- Fenchel, T. & Finlay, B. J. (1991). The biology of free-living anaerobic ciliates. *European Journal of Protistology*, 26(3-4):201–215.
- Fenchel, T., & Finlay, B. J., (2004). The ubiquity of small species: Patterns of local and global diversity. *BioScience*, 54(8):777–784.
- Fenchel, T., & Finlay, B. J. (2010). Free-living protozoa with endosymbiotic methanogens in Hackstein, J. H. P. (Endo)symbiotic methanogenic Archaea. Springer, 1–11.
- Fernández-Galiano, D. (1976). Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. *Transactions of the American Microscopical Society*, 95:557–560.
- Foissner, W. (1980). Taxonomische studien über die ciliaten des Grossglocknergebietes (Hohe Tauern, Österreich). IX. ordnungen Heterotrichida und Hypotrichida. *Berichte des Naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins Salzburg*, 5:71–117.
- Foissner, W. (1981). Morphologie und taxonomie einiger heterotricha und peritriche ciliaten (Protozoa: Ciliophora) aus Alpinen böden. *Protistologica*, 98(17):29–43.

- Foissner, W. (1987). Soil protozoa: fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicators, and guide to the literature. *Progress in Protistology*, 2:69–212.
- Foissner, W. (1993). Colpodea (Ciliophora). Fischer, 798pp.
- Foissner, W. (1997). Soil ciliates (Protozoa: Ciliophora) from evergreen rain forests of Australia, South America and Costa Rica: diversity and description of new species. *Biology and Fertility of Soils*, 25:317–339.
- Foissner, W. (1999). Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74:95–112.
- Foissner, W. (2006) Biogeography and Dispersal of Microorganisms: A Review Emphasizing Protists. *Acta Protozoologica*, 45:111–136.
- Foissner, W. (2014). An update of 'Basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(1):271-292.
- Foissner, W. (2016). Terrestrial and semiterrestrial ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Venezuela and Galápagos. *Denisia*, 35:912pp.
- Foissner, W., & Agatha, S. (1999). Morphology and morphogenesis of *Metopus hasei* Sondheim, 1929 and *M. inversus* (Jankowski, 1964) nov. comb. (Ciliophora, Metopida). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46:174–193.
- Foissner, W., Agatha, S., & Berger, H. (2002). Soil ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Namibia (Southwest Africa), with emphasis on two contrasting environments, the Etosha Region and the Namib desert. *Denisia*, 05:1–1063.
- Fokam Z., Nana, P-A., Ngassam, P., Bricheux, G., Bouchard, P., Vignes, B., & Sime-Ngando, T. (2013). Description of two new species of Sicuophoridae and Nyctotheridae (Heterotrichina), endocommensal in the rectal ampulla of *Bufo regularis* (Amphibia: Anura) from the Northwest of Cameroon. *Protistology*, 8(1):16–21.
- Fokam Z., Nana, P-A., Ngassam, P., Bricheux, G., Bouchard, P., Vignes, B., & Sime-Ngando, T. (2014). Morphological description of four new species of *Nyctotherus* (Ciliophora: Nyctotheridae: Heterotrichida), commensal ciliates of the digestive tract of a terrestrial Oligochaete (Megascolecidae) from the northwest region of Cameroon. *Protistology*, 8(2):62–70.
- Gao, F., Warren, A., Zhang, Q., Gong, J., Miao, M., Sun, P., Xu, D., Huang, J., Yi, Z., & Song, W.B. (2016). The all-data-based evolutionary hypothesis of ciliated protists with a revised classification of the phylum Ciliophora (Eukaryota, Alveolata). *Scientific Reports*, 6:24874.
- Geiman, Q. M., & Wichterman, R. (1937). Intestinal Protozoa from Galapagos Tortoises (With descriptions of three new species). *The Journal of Parasitology*, Vol. 23(4):331–347.
- de Graaf, R. M., Ricard, G., van Alen, T. A., Duarte, I., Dutilh, B. E., Burgdorf, C., ... & Hackstein, J. H. (2011). The organellar genome and metabolic potential of the hydrogen-producing mitochondrion of *Nyctotherus ovalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2379–2391.
- Guhl, B., Finlay, B. J., & Schink (1996). Comparison of ciliate communities in the anoxic hypolimnia of three lakes: general features and the influence of lake characteristics. *Journal of Plankton Research*, 18(3):335-353.
- He Y., & Choi J. K. (2015). First record of four soil ciliates from Korea. *Korean Journal of Environmental Biology*, 33(2):215–222.

- Hegner R. (1940). *Nyctotherus beltrani* n. sp., a Ciliate from an Iguana. *The Journal of Parasitology*, 26(4):315–317.
- van Hoek, A., Alen, T., Sprakel, V. S. I., Hackstein, J. H. P., & Vogels, G. (1998). Evolution of anaerobic ciliates from the gastrointestinal tract: Phylogenetic analysis of the ribosomal repeat from *Nyctotherus ovalis* and its relatives. *Molecular Biology and Evolution*, 15(9):1195–1206.
- van Hoek, A., Alen, T. A., Vogels, G., & Hackstein, J. (2006). Contribution by the methanogenic endosymbionts of anaerobic ciliates to methane production in Dutch freshwater sediments. *Acta Protozoologica*, 45:215–224.
- Holmes, D., Giloteaux, L., Williams, K., Wrighton, K., Wilkins, M., Thompson, C., Roper, T., Long, P. & Lovley, D. (2013). Enrichment of specific protozoan populations during in situ bioremediation of uranium-contaminated groundwater. *The ISME Journal*, 7(7):1286–98.
- Holmes, D., Giloteaux, L., Orellana, R., Williams, K. H., Robbins, M. J. & Lovley D. (2014). Methane production from protozoan endosymbionts following stimulation of microbial metabolism within subsurface sediments. *Frontiers in Microbiology*, 5:366.
- Irwin, N., Pittis, A., Mathur, V., Howe, L., Lynn, D., & Bourland, W. A. (2020). The function and evolution of motile DNA replication systems in ciliates. *Current Biology*, 31(1):66–76.e6.
- Jankovskij, A. (1964). Morphology and evolution of Ciliophora.III. Diagnoses and phylogenesis of 53 sapropelebionts, mainly of the order Heterotrichida. *Archiv für Protistenkunde*, 107:185–294.
- Kahl, A. (1927). Neue und ergänzende Beobachtungen heterotricher Ciliaten. *Archiv für Protistenkunde*, 57:121–203.
- Kahl, A. (1931). *Metopus*, eine interessante Infusorien gattung (infusoria Heterotricha). *Mikrokosmos*, 24:7–12.
- Kahl, A. (1932). Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria) 3. Spirotricha. *Die Tierwelt Deutschlands*, 25:399–650.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14):3059–3066.
- Kidder, G. W. (1937). The intestinal protozoa of the wood-feeding roach *Panesthia*. *Parasitologica*, 29:163–205.
- Kim, S., Choi, J., Ryu, S., & Min, G-S. (2011). Single-cell PCR on protargol-impregnated euplotid ciliates: A combined approach of morphological and molecular taxonomy. *Animal Cells and Systems*, 15:251–258.
- Kreutz, M., & Foissner W. (2006). The sphagnum ponds of Simmelried in Germany: A biodiversity hot-spot for microscopic organisms. Protozoological Monographs, vol. 3. Shaker-Publishers, 267pp.
- Kumar, S., Tamura, K., & Nei, M. (1994). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Computer Applications in the Biosciences*, 10(2):189–191.
- Li, C., Zhao, W., Zhang, D., Wang, R., Wang, G., Zou, H., Li, W., Wu, S., & Li, M. (2018). *Sicuophora* (Syn. *Wichtermania*) *multigranularis* from *Quasipaa spinosa* (Anura): morphological and molecular study, with emphasis on validity of *Sicuophora* (Armophorea, Clevelandellida). *Parasite*, 25:38.

- Li, M., Sun, Z. Y., Grim, J., Ponce-Gordo, F., Wang, G. T., Zou, H., Li, W. & Wu, S. (2016). Morphology of *Nyctotheroides hubeiensis* Li et al., 1998 from frog hosts with molecular phylogenetic study of Clevelandellid ciliates (Armophorea, Clevelandellida). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(6):751–759.
- Li, M., Hu, G., Li, C., Zhao, W. S., Zou, H., Li, W. X., Wu, S. G., Wang, G. T. & Ponce-Gordo, F. (2020). Morphological and molecular characterization of a new ciliate *Nyctotheroides grimi* n. sp. (Armophorea, Clevelandellida) from Chinese frogs. *Acta Tropica*, 17(208):105531.
- Li, S., Bourland, W. A., Al-Farraj, S. A., Li, L. & Hu, X. (2017). Description of two species of caenomorphid ciliates (Ciliophora, Armophorea): Morphology and molecular phylogeny. *European Journal of Protistology*, 61(Pt A):29-40.
- Li, S., Zhuang, W., Pérez-Uz, B., Zhang, Q., & Hu, X. (2021). Two anaerobic ciliates (Ciliophora, Armophorea) from China: morphology and SSU rDNA sequence, with report of a new species, *Metopus paravestitus* nov. spec. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 68(1):e12822.
- Lucas, M. S. (1934). Ciliates from Bermuda sea urchins I. *Metopus*. *Journal of the Royal Microscopical Society*. 44:79–93.
- Lucas, C. L. T. (1928). A study of excystation in *Nyctotherus ovalis*. *Journal of Parasitology*, 14:161–175.
- Lynn, D. (2008). *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature*. 3rd ed. Springer, 605 pp.
- Lynn, D. (2017). Ciliophora in Archibald, J. M., Simpson, A. G. B., & Slamovits, C. H., eds. Handbook of the Protists Second Edition. Springer, 679–730.
- Lynn, D., & Pinheiro M. (2009) A survey of polymerase chain reaction (PCR) amplification studies of unicellular protists using single-cell PCR. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(5):406–412.
- Lynn, D., & Wright, A. D. (2013). Biodiversity and molecular phylogeny of Australian *Clevelandella* species (Class Armophorea, Order Clevelandellida, Family Clevelandellidae), intestinal endosymbiotic ciliates in the wood-feeding roach *Panesthia cribrata* Saussure, 1864. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(4):335–341.
- Medlin, L., Elwood, H. J., Suckel, S., & Sogin, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 7:491–499.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. in Proceedings of the Gateway Computing Environments Work-shop (GCE), 1–8.
- Mori, G., Mattioli, M., Madoni, P., Ferri, G., G. N., Baldaccini, Bianucci, P., & Ricci, N. (1996). Ciliated protozoa from Lake Massaciuccoli (Western Tuscany). *Atti della Società Toscana di Scienze Naturali, Memorie Serie B*, 103:89–97.
- Müller, O. F. (1786). Animalcula infusoria fluviatilia et marina, quaedetexit, systematice descripsit et ad vivum delineari curavit. N.Möller, Havniae et Lipsiae.
- Narayanan, N. (2011). Role of *Metopus es* in the anaerobic degradation of organic matter and biomethanation process. Doktorská práce. University of Kerala.
- Norman Grim, J. (1992). Descriptions of two sympatric and phylogenetically diverse ciliated protozoa, *Balantidium zebrascopei* n. sp. and *Paracichlidotherus leeuwenhoekii* n. gen., n. sp., symbionts in the intestines of the surgeonfish, *Zebrasoma scopas*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 111:149–157.

- Norman Grim, J. (1998). A comparison of three populations of the ciliate genus, *Paracichlidotherus* Grim 1992. New fish hosts, and biogeography; Revised genus description. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(1):40–44.
- Norman Grim, J., Reed K. S., & Fishelson, L. (1996). Description of a new species of ciliates, *Metanydotherus paulini* n.sp., Symbiont from the intestines of the angelfish *Apolemichthys xanthotis*. Assessment of species Status for extant *Metanyctootherans*. *Archiv für Protistenkunde*, 146(3–4):341–347.
- Omar, A., Zhang, Q., Zou, S., & Gong, J. (2017). Morphology and phylogeny of the soil ciliate *Metopus yantaiensis* n. sp. (Ciliophora, Metopida), with identification of the intracellular bacteria. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(6):792–805.
- Pecina, L., & Vďačný, P. (2020). Morphological versus molecular delimitation of ciliate species: a case study of the family Clevelandellidae (Protista, Ciliophora, Armophorea). *European Journal of Taxonomy*, (697):1–46.
- Priya M., Shibuvardhan Y., & Manilal V. B. (2019). Response of anaerobic protozoa to oxygen tension in anaerobic system. *International Microbiology*, 22(3):355–361.
- Puytorac, P. de., & Grain, J. (1969). Structure et ultrastructure de *Sicuophora xenopi* n. gen., n. sp., cilié hétérotriche parasite du batracien *Xenopus fraseri*. *Protistologica*, 4:405–414.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12):1572–1574.
- Rotterová, J. (2015). Morfologická a molekulární diverzita volně žijících zástupců čeledi Metopidae a objev nové linie anaerobních nálevníků. Diplomová práce. Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova.
- Rotterová, J., Bourland, W. A., & Čepička, I. (2018). Tropidoactinidae fam. nov., a deep branching lineage of Metopida (Armophorea, Ciliophora) found in diverse habitats and possessing prokaryotic symbionts. *Protist*, 169(3), 362–405.
- Rotterová, J., Salomaki, E., Pánek, T., Bourland, W. A., Žihala, D., Táborský, P., Edgcomb, V. B., Beinart, R. A., Kolísko, M. & Čepička, I. (2020). Genomics of new ciliate lineages provides insight into the evolution of obligate anaerobiosis. *Current Biology*, 30(11):2037-2050.
- da Silva Paiva, T., Borges, B. D. N., & da Silva-Neto, I. D. (2013). Phylogenetic study of Class Armophorea (Alveolata, Ciliophora) based on 18S-rDNA data. *Genetics and Molecular Biology*, 36:571–585.
- Sondheim, M. (1929) Protozoen aus der Ausbeute der Voeltzkowschen Reisen in Madagaskar und Ostafrika. *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft*, 41:283–313.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21):2688-2690.
- Tucolesco, J. (1962). Études protozoologiques sur les eaux Roumaines I. Espèces nouvelles d'infusoires de la mer noire et des bassins sales paramarins. *Archiv für Protistenkunde*, 106:1–36.
- Vďačný, P. (2007). Morphology and infraciliature of the soil ciliate *Metopus hasei* Sondheim, 1929 (Ciliophora, Armophorida) from Biele Karpaty Mountains (Slovakia). *Protistology*, 5(2/3):231-236.
- Vďačný, P., & Foissner, W. (2017a). A huge diversity of metopids (Ciliophora, Armophorea) in soil from the Murray River floodplain, Australia. I. Description of five new species and redescription of *Metopus setosus* Kahl, 1927. *European Journal of Protistology*, 58:35–76.

Vďačný, P., & Foissner, W. (2017b). A huge diversity of metopids (Ciliophora, Armophorea) in soil from the Murray River floodplain, Australia. II. Morphology and morphogenesis of *Lepidometopus platycephalus* nov. gen., nov. spec. *Acta Protozoologica*, 2017:39-57.

Vďačný, P., & Foissner, W. (2019). A huge diversity of metopids (Ciliophora, Armophorea) in soil from the Murray River floodplain, Australia. III. Morphology, ontogenesis and conjugation of *Metopus boletus* nov. spec., with implications for the phylogeny of the SAL supercluster. *European Journal of Protistology*, 69:117–137.

Vďačný, P., Ěrsekov, E., Šoltys, K., Budiř, J., Pecina, L., & Rurik, I. (2018). Co-existence of multiple bacterivorous clevelandellid ciliate species in hindgut of wood-feeding cockroaches in light of their prokaryotic consortium. *Scientific Reports*, 8(1):17749.

Vďačný, P., Rajter, L., Stoeck, T., & Foissner, W. (2019). A Proposed Timescale for the Evolution of Armophorean Ciliates: Clevelandellids Diversify More Rapidly Than Metopids. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1):167–181.

Vogels, G. D., van der Drift, C., Stumm, C. K., Keltjens, J. T. M., & Zwart, K. B. (1984). Methanogenesis: surprising molecules, microorganisms and ecosystems. *Antonie van Leeuwenhoek*, 50(5-6):557–567.

Vuxanovici, A. (1962). Contributii la sistematica ciliatelor (Nota 11). *Studii ři cercetri de biologie* (Seria „biologie animala”), 14:331–349.

Yamashiro, S. (2016). Remoção de Giardia e Cryptosporidium, ocorrência de microspordios e caracterizao da microfauna de um sistema combinado de tratamento de esgoto. Doktorsk práce. Universidade estadual de Campinas, Instituto de biologia.

Zhuang, W., Song, L., Bai Y, Zhang, T., Al-Rasheid, K. A. S. & Hu, X. (2021). Morphology and molecular phylogeny of the anaerobic freshwater ciliate *Urostomides spinosus* nov. spec. (Ciliophora, Armophorea, Metopida) from China. *European Journal of Protistology*, IN PRESS