

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Zoologie



Mgr. Eva Mazancová

Fylogenetická a morfologická diverzita volně žijících diplomonád
Phylogenetic and morphological diversity of free-living diplomonads

Rigorózní práce

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

Praha, 2024

Poděkování

Mé díky patří zejména profesorovi RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph.D. – bez něj bych se nedostala až ke psaní této práce. Děkuji rovněž své drahé rodině, která je mou celoživotní motivací.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Na vědeckém článku, na kterém je tato práce založena, jsem se podílela provedením experimentů, následnou analýzou výsledků a konečně samotným sepsáním manuskriptu.

V Praze dne

Eva Mazancová

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt | 5 |
| Abstract | 6 |
| Úvod | 7 |
| Shrnutí výsledků..... | 8 |
| Světelná mikroskopie | 9 |
| Elektronová mikroskopie | 10 |
| Molekulárně-fylogenetická analýza založená na genu pro SSU rRNA | 10 |
| Diskuse | 11 |
| Morfologie..... | 11 |
| Fylogeneze a evoluce | 12 |
| Závěr | 15 |
| Seznam použité literatury | 16 |
| Příloha | 20 |

V této práci budou používány následující počestěné názvy:

Pro řád Diplomonadida: diplomonády (femininum, genitiv plurálu „diplomonád“).

Pro čeleď Enteromonadidae: enteromonády (femininum, genitiv plurálu „enteromonád“).

Pro rod *Trepomonas*: trepomonas (femininum, genitiv singuláru „trepomonády“).

Pro skupinu Fornicata: fornikáta (neutrum, genitiv plurálu „fornikát“).

Pro rod *Giardia*: giardia (femininum, genitiv singuláru „giardie“).

Abstrakt

Řád Diplomonadida, který spadá do skupiny Fornicata (Metamonada), je skupina anaerobních prvoků, z nichž většina jsou endobionti. Nejznámějším zástupcem tohoto řádu je *Giardia intestinalis*, parazit napadající mimo jiné i člověka. Giardii se již věnoval nespočet různých studií, nicméně diplomonády mají i volně žijící zástupce. Ti byli donedávna výzkumem opomíjeni, a to i navzdory tomu, že volně žijící diplomonády se vyvinuly z endobiotických předků a jsou tedy jedním ze vzácných exemplářů sekundárně volně žijících organismů.

Celkem jsme získali a analyzovali 65 nových sekvencí genu pro SSU rRNA diplomonád ze skupiny Hexamitinae, přičemž 58 z nich patřilo volně žijícím zástupcům. Studovali jsme morfologii vybraných izolátů rodů *Trepomonas*, *Hexamita* a *Gyromonas*, a jako první jsme se zabývali ultrastrukturou druhu *Trepomonas rotans*. V naší fylogenetické analýze se rod *Hexamita* rozdělil na čtyři nepřibuzné linie a jedna z nich je potenciálně brakická/slanovodní. Rovněž rod *Trepomonas* vyšel jako polyfyletický, jelikož druh *T. rotans* se oddělil od zbytku trepomonád. Domníváme se, že by se mohlo jednat o nový rod. Ultrastrukturní studie navíc u *T. rotans* odhalila přítomnost unikátních povrchových šupin.

Studie příbuznosti volně žijících a endobiotických diplomonád, i rozpad unizoických zástupců do několika oddělených skupin naznačují, že evoluce volně žijících diplomonád je složitější, než by se mohlo na první pohled zdát, a je opravdu hodna podrobného studia.

Klíčová slova: Diplomonadida, fylogeneze, *Hexamita*, *Trepomonas*.

Abstract

Free-living diplomonads are an interesting, but underrated part of genus Diplomonadida. Belonging to Fornicata (Metamonada), diplomonads are anaerobic protists lacking classical mitochondrion. Most of them are endobiotic with *Giardia intestinalis* being the most well known as well as the main focus of many studies. Free-living diplomonads on the other hand, whilst claimed to be secondarily free-living and therefore are an interesting subject of phylogenetic studies, have been largely neglected.

We obtained and analyzed 65 new sequences of diplomonad SSU rRNA gene, of which 58 belonged to free-living species (specifically genera *Gyromonas*, *Hexamita*, *Trepomonas* and *Trimitus*). We also performed a light-microscopic morphological study of selected strains. The ultrastructure of *Trepomonas rotans* was studied for the first time.

Our phylogenetic analysis revealed genus *Hexamita* and also genus *Trepomonas* as polyphyletic. *Trepomonas rotans*, which forms a separate branch related to genus *Hexamita*, may actually be a novel genus. This is further supported by the fact that this species has the cell covered in scales, which is a trait unique in Diplomonadida. Our results show a complex evolutionary process in free-living diplomonads, therefore being genuinely worthwhile of further research.

Key words: Diplomonadida, phylogeny, *Hexamita*, *Trepomonas*.

Úvod

Řád Diplomonadida (diplomonády) spadá do skupiny Fornicata společně s řádem Retortamonadida, čeledí Caviomonadidae a *Carpediemonas*-like-organisms (CLOs) (Grassé, 1952; Cavalier-Smith, 2003; Hampl et al., 2005). Skládá se převážně ze zástupců s endobiotickým způsobem života, mezi nimiž můžeme najít jak komenzály, tak parazity ekto- i endotermních živočichů, člověka nevyjímaje. Volně žijících zástupců diplomonád je menšina a až donedávna se jim nevěnovala větší pozornost, protože byli zastíněni svými slavnějšími parazitickými příbuznými. Studium se vždy zaměřovalo na endobiotické diplomonády, především na parazita *Giardia intestinalis*, který napadá i člověka. Infekce se může obejít bez výraznějších projevů, ale může způsobit i velmi vážné průjmové onemocnění spojené s malabsorpcí živin. Není tedy nijak překvapivé, že se pozornost upřela právě na giardii. Velmi významný je ale i rod *Spironucleus*, jehož příslušníci jsou obligátní endobionti a napadají ryby, ptáky i savce (Adam, 2017).

Volně žijící diplomonády vždy byly spíše na okraji vědeckého zájmu. Většina dnes známých druhů byla objevena už v 19. století (Dujardin, 1841; Klebs, 1892) a zhruba od poloviny dvacátého století nebyly popsány vůbec žádné další druhy volně žijících diplomonád (což je poněkud s podivem, když vezmeme v úvahu, že alespoň nějakou buňku lze nalézt v sedimentu téměř jakékoliv stojaté vodní plochy). Vysvětlit to lze jednak poměrně komplikovanou kultivací a manipulací, a jednak faktem, že zdaleka nejzajímavější se na volně žijících diplomonádách zdá být jejich fylogeneze. S ohledem na to, že rozmach intenzivního výzkumu fylogenetických vztahů je poměrně nedávného data, je pochopitelné, že teprve v poslední době se začíná věda o volně žijící diplomonády opět trochu zajímat. Podle fylogenetických analýz – jak molekulárních, tak morfologických – je už delší dobu zřejmé, že se volně žijící diplomonády vyvinuly z endobiotických předků, a to dokonce několikrát nezávisle na sobě (Siddall et al., 1992; Simpson, 2003; Kolisko et al., 2005; Kolisko et al., 2008). Jsou tedy živoucím příkladem jinak neobvyklého jevu, kdy dojde k sekundární adaptaci původně endobiotického organismu na život ve vnějším prostředí. Množství DNA sekvencí ve fylogenetických studiích bylo nicméně až dosud vždy velmi malé, a proto jsme založili rozsáhlou sbírku kultur volně žijících diplomonád a prostudovali jsme jejich biodiverzitu pomocí analýzy genu pro SSU rRNA (Mazancová et al., 2023).

Buňky diplomonád jsou v mnoha ohledech pozoruhodné. Protože diplomonády žijí v prostředích chudých na kyslík, nemají klasické mitochondrie, ale pouze jejich redukované verze (anglicky mitochondrion-related organelles – MROs) – hydrogenosomy nebo mitosomy

(Roger et al., 1998; Tachezy et al., 2001; Tovar et al., 2003; Millet et al., 2013; Jelström-Hultquist et al., 2013; Yubuki et al., 2017; Vargová et al., 2022). Chybí rovněž klasický Golgiho aparát (Eyden and Vickerman, 1975) i další některé struktury – například klenutá B-fibrila, která je jedinou známou ultrastrukturální synapomorfií skupiny Fornicata (Simpson, 2003). Bičkový aparát diplomonád je asociovaný s jádrem, společně tvoří útvar zvaný karyomastigont (Brugerolle, 1975). Buňky mají buď jeden, nebo dva karyomastigonty a podle toho se dělí na unizoické a diplozoické. Mezi unizoické diplomonády, také zvané enteromonády (dříve čeled' Enteromonadidae (Kulda and Nohýnková, 1978), patří rody *Enteromonas* a *Trimitus*. Diplozoickou stavbu mají například výše zmíněné rody *Giardia* a *Spironucleus*, a dále pak volně žijící rod *Trepomonas* nebo rod *Hexamita*, který zahrnuje volně žijící i endobiotické druhy. Jádra diplozoických diplomonád jsou umístěna symetricky v přední části buňky a jejich tvar se mezi druhy různí, od kulatých až po půlměsícově zakřivená. Buňky mají nejčastěji čtyři páry bičků, některé rody však mají méně – *Trigonomonas* má tři páry (Klebs, 1892) a *Gyromonas* dokonce jen dva páry (Seligo, 1886). Většina diplomonád má cytostomy – buď tubulární nebo kapsovitě, v obou případech však asociované se zpětným bičkem (Brugerolle, 1975). Některé rody diplomonád cytostomy zcela ztratily (např. *Giardia*) a živí se pinocytózou (Brugerolle, 1975; Desser et al., 1993, Brugerolle and Müller, 2000).

Podle analýz genu pro SSU rRNA ani unizoické, ani diplozoické diplomonády netvoří monofyletické linie (Siddall et al., 1992; Simpson, 2003; Kolisko et al., 2005; Kolisko et al., 2008), jedná se tedy o morfotypy. V současné době se řád Diplomonadida dělí na dvě podčeledi: Hexamitinae a Gardiinae (Kolisko et al., 2008) (v jiných klasifikacích jsou tyto taxony pojmenovány Distomatina a Gardiina (Cavalier-Smith 2013). Skupina Hexamitinae (Distomatina) zahrnuje jak diplozoické, tak unizoické zástupce, do skupiny Gardiinae (Gardiina) pak spadají pouze diplozoičtí endobionti bez cytostomů.

Shrnutí výsledků

Naše sbírka obsahovala celkem 58 kultur volně žijících diplomonád z anoxických sedimentů. Tyto pocházely především ze sladkovodního prostředí, pouze dva vzorky (izolát NORSKO a izolát AYEN) byly prokazatelně odebrány z brakických vod. Dále jsme kultivovali šest endobiotických linií ze střev hmyzu, z pijavic a z výkalů žab. Kultury v převážné většině případů nebyly monoeukaryotické a obvykle se v nich nacházely také organismy z následujících skupin: Heterolobosea, Euglenozoa, Ciliophora, příležitostně i z jiných. Většina

kultur byla spíše nestabilní, ačkoliv kultivační podmínky byly zachovávány stále stejné. V nepravidelných intervalech docházelo k výrazným výkyvům v hustotě buněk i v jejich celkové kondici – např. rychlosti pohybu nebo tvaru. I stabilní kultury málokdy dosáhly vyšších hustot buněk diplomonád a v několika případech dokonce do té doby zdánlivě stabilní a dobře narostlá kultura náhle uhynula. Práce s volně žijícími diplomonádami tedy byla poměrně komplikovaná a vyžadovala přizpůsobivost aktuálnímu stavu kultur.

Světelná mikroskopie

Rod Trepomonas

Podle morfologie jsme určili čtyři druhy rodu *Trepomonas*, a to *T. agilis*, *T. latecapitata*, *T. steinii* a *T. rotans*. Buňky trepomonád v našich kulturách byly v souladu s literaturou předozadně zploštělé, měly více či méně otevřené, dobře viditelné kapsovitité cytotomy a tvar jader byl půlměsícový nebo kapkovitý. Dva páry bičků se nacházely v první třetině buňky a druhé dva páry v kapsovitých cytotomech, odkud mohou, ale nemusí vyčnívat ven. Buňky byly spirálně zakroucené, vyjma buněk druhu *T. rotans*, které byly sice výrazně předozadně zploštělé, avšak spirální zakroucení nebylo přítomno.

Dvacet tři kultur bylo identifikováno jako příslušných k rodu *Trepomonas*, ale jejich morfologie se neshodovala s žádným z dosud popsaných druhů. Podle naší fylogenetické analýzy se tyto trepomonády rozdělily do tří oddělených linií, které si jsou blízce příbuzné. Mezi izoláty z těchto tří skupin trepomonád byly zaznamenány rozdíly v morfologii (tvar buňky, šíře kapsovitých cytotomů) a tyto korespondovaly s umístěním izolátů v odlišných liniích. Dvě endobiotické kultury z larev brouků podle vzhledu svých buněk rovněž patřily do rodu *Trepomonas*, ale jejich kultivace nebyla úspěšná a nebylo možné je tedy podrobně prostudovat.

Provedli jsme také měření živých buněk všech pozorovaných druhů i linií trepomonád. Největším druhem je *T. agilis* s průměrnou délkou buňky 15,6–16,1 μm v závislosti na izolátu a nejmenším *T. steinii* s průměrnou délkou buňky 9,6–11,4 μm .

Během studia preparátů barvených protargolem jsme zaznamenali u *T. rotans* silné obarvení okraje buněk, které se ovšem neobjevovalo u stejně zpracovaných preparátů žádné jiné diplomonády, se kterou jsme pracovali.

Rod Hexamita

Sedm z našich kultur obsahovalo zástupce rodu *Hexamita*. Jejich morfologie byla ve všech případech, až na drobné odchylky velikosti, stejná. Buňky nebyly předozadně zploštělé, jejich

přední část byla oblá a zadní část rovná. Jádra měla kulatý nebo elipsoidní tvar. Cytostomy byly uzavřené, tubulární a na světelném mikroskopu byly špatně viditelné. Velmi charakteristické jsou dva dlouhé vlečné bičíky. Velikost buněk se pohybovala v rozmezí kolem 12–14 μm .

Rod *Gyromonas*

Rod *Gyromonas* jsme pozorovali pouze ve třech kulturách a všechny tři jsme určili jako druh *Gyromonas ambulans*. Fylogenetická analýza posléze potvrdila, že všechny izoláty patří ke stejnému druhu. Jsou to nejmenší z námi pozorovaných diplomonád, průměrná délka buňky činila 7,1 μm . Pozorované buňky měly trojúhelníkovitý tvar bez spirálního zakroucení, dva úzké kapsovité cytostomy a dvě špatně viditelná jádra pŕlměsícového tvaru. Bičíky jsme pozorovali pouze výjimečně. Buňky často přisedaly k povrchu a poté jsme u nich pozorovali metabolický pohyb.

Elektronová mikroskopie

Buňky rodu *Trepomonas rotans* (izolát FB, vyznačující se dobrou kondicí a relativní stabilitou v kultuře) jsme studovali pod transmisním a skenovacím elektronovým mikroskopem. Naše data ukázala, že celý povrch buněk – kromě prostoru cytostomálních kapes – je pokryt šupinkovitými útvary. Tyto šupiny mají kloboukovitý tvar a jsou 60 nm široké a 40 nm vysoké. Tři páry bičíků jsou ukotveny v těsné blízkosti nad cytostomálními kapsami – jeden pár směřuje vpřed a zbylé dva páry vzad. Čtvrtý pár bičíků, který rovněž směřuje vzad, je ukotven uvnitř cytostomálních kapes, v jejich horní části. Tento pár bičíků je nejkratší, svou délkou odpovídá zhruba délce cytostomálních kapes, a na rozdíl od zbylých tří párů bičíků prochází skrz kapsy.

Molekulárně-fylogenetická analýza založená na genu pro SSU rRNA

V naší fylogenetické analýze jsme zpracovali celkem 65 izolátů především volně žijících diplomonád, u kterých jsme sekvenovali gen pro SSU rRNA. Všechny izoláty spadají do skupiny Hexamitinae, která se v souladu s předchozími studii rozdělna na tři linie (Jorgensen & Sterud, 2007; Kolisko et al., 2008). Dvě ze tří linií se skládají výhradně ze zástupců rodu *Spiroucleus* – první skupina ze *Spiroucleus salmonicida*, *S. barkhanus* a *S. torosa* a druhá ze *S. vortens* a *S. salmonis*. Ve třetí skupině se nachází zbylé druhy rodu *Spiroucleus* a všechny ostatní rody patřící do Hexamitinae (tedy *Trepomonas*, *Hexamita*, *Gyromonas*, *Enteromonas*, *Trimitus*), včetně všech environmentálních sekvencí a nepopsaných izolátů PYX, PSEUD a CERAT3.

Fylogenetické vztahy ve třetí skupině zůstávají nejasné, jelikož žádná z vnitřních skupin v naší analýze neměla vysokou podporu. Pozice větve obsahující *Spironucleus muris* a *S. meleagridis* se měnila v závislosti na použité metodě analýzy. Unizoické diplomonády – enteromonády – se rozdělily do tří nepříbuzných linií, přičemž rodu *Trimitus* byl s vysokou podporou příbuzný diplozoický druh *Gyromonas ambulans*. Rod *Trepomonas* rovněž nevytvořil monofyletickou skupinu, protože druh *T. rotans* se v naší analýze umístil jako blízce příbuzný rodu *Hexamita* (konkrétně liniím III a IV, viz níže). Tato pozice sice nebyla podpořená, ale objevila se v obou metodách analýzy. Zbytek rodu *Trepomonas* vytvořil nepodpořenou skupinu, která obsahovala druhy *T. steinii*, *T. latecapitata*, *T. agilis*, endobiotickou *Trepomonas* sp. 1 a další tři linie dosud nepopsaných trepomonád (*Trepomonas* spp. 2–4). Endobiotická *Trepomonas* sp. 1 vyšla blízce příbuzná k *T. agilis*. Linie 2 a 3 byly dobře podpořeny, naopak linie 4 neměla v naší analýze podporu. V linii *Trepomonas* sp. 2 se nachází již dříve publikovaný izolát PPS6 (Kolisko et al., 2008).

Rod *Hexamita* se v naší fylogenetické analýze rozpadl do čtyř samostatných linií, které jsme pracovně označili jako I – IV. Do první linie spadají environmentální sekvence a čtyři naše izoláty. Linie II obsahuje endobiotický druh *H. nelsoni*, který parazituje na ústřicích. K němu se zařadil náš volně žijící izolát SEB5, nicméně tato pozice neměla podporu. Dobře podpořená však byla linie III, do které patří volně žijící *H. inflata*, nicméně k ní se zařadil i endobiotický strain PI1. Do čtvrté linie pak spadají izoláty BOTAN1 a ZOO1.

Diskuse

Morfologie

Celkem jsme světelnou mikroskopií a fylogenetickou analýzou genu pro SSU rRNA v našich kulturách určili přítomnost následujících čtyř rodů diplomonád: *Trepomonas*, *Hexamita*, *Gyromonas* a *Trimitus*. K určování jsme používali studii Klebse (1892) a klíč sestavený Mylnikovem (1985).

Trepomonas Dujardin, 1841. Identifikovali jsme čtyři z momentálně popsanych šesti druhů: *T. agilis* Dujardin, 1841, *T. latecapitata* Skuja, 1956, *T. steinii* Klebs, 1892 a *T. rotans* Klebs, 1892. Vzhledem ke značné morfologické diverzitě a rozdílům ve způsobu pohybu viditelným na první pohled, byly izoláty těchto druhů snadno určitelné. Hodně izolátů rodu *Trepomonas* však nebylo možné určit, protože po porovnání našich dat s literaturou jejich

morfolgie neodpovídala žádnému dosud popsanému druhu rodu *Trepomonas*. Potenciálně se tedy jedná o nové, dosud nepopsané druhy. Během fylogenetické analýzy tyto izoláty vytvořily tři jasně oddělené linie, což podporuje naši domněnku. Nemáme ovšem dostatek morfolgických dat na to, abychom mohli ustanovit stabilní rozpoznávací znaky a druhy formálně popsat.

Hexamita Dujardin, 1841. Vinou vysoké citlivosti buněk rodu *Hexamita* na změny prostředí, a tedy celkově komplikované manipulace, jsme opatřili málo morfolgických dat na to, aby se nám podařilo určovat druhy našich izolátů. Pozorovali jsme sice rozdílnosti v morfolgii mezi různými izoláty – konkrétně v délce a tvaru buňky a také ve viditelnosti cytostomů –, stejně jako u části izolátů rodu *Trepomonas* však nebylo možné tyto rozdíly použít jako stabilní poznávací znaky.

Vzhledem k tomu, že všechny izoláty volně žijících diplomonád, se kterými jsme se dosud setkávali, byly sladkovodní, zaujala nás u rodu *Hexamita* existence potenciální brakické nebo slanovodní linie. Izolát NORSKO (linie I) pocházel z brakických vod, stejně jako izolát AYEN (rovněž linie I). Přesné místo odběru zbylých příbuzných izolátů nebylo možno dohledat – zároveň však nebylo možno zcela vyloučit, že byly odebrány z brakických nebo slaných vod. Environmentální sekvence příbuzné s NORSKO a AYEN také pocházely z brakického nebo salinního prostředí. Bylo by potřeba více dat na potvrzení existence slanovodní linie. Nebylo by to však poprvé, co byla v rámci volně žijících diplomonád objevena, jelikož už Ruinen (1938) popsal mořský druh rodu *Gyromonas*. Slanovodní původ by potvrzoval, že rod *Hexamita* není monofyletický.

Gyromonas Seligo, 1886. Rod *Gyromonas* obsahuje dva druhy: Sladkovodní *G. ambulans* Seligo, 1886 a slanovodní *G. salinus* Ruinen, 1938. S ohledem na prostředí i na velikost buňky, jsme naše izoláty identifikovali jako *G. ambulans*.

Fylogeneze a evoluce

Jakkoliv jsme byli spokojeni s rozsahem naší sbírky kultur a výsledným počtem téměř 60 nových izolátů, jsme si vědomi, že analýzy samotného genu pro SSU rRNA nemají dostatečnou sílu, abychom mohli považovat fylogenetické vztahy volně žijících diplomonád za vyřešené. Rozhodně ale tato analýza poskytuje zajímavý vhled do evoluce Hexamitinae.

Rod *Spironucleus*, který se nachází na bázi Hexamitinae, v naší analýze vyšel parafyletický. To je souladu s dalšími studiemi, které došly ke stejnému závěru

(např. Leger et al., 2017). Jeho vzhled s tubulárními cytostomy by tak mohl být ancestrálním pro skupinu Hexamitinae. Fakt, že rod *Hexamita* nevyšel jako monofyletický, není tedy nijak překvapivý – buňky mají plesiomorfní vzhled velmi podobný rodu *Spiroucleus*, od kterého se liší pouze tvarem jader.

Zjištění, že je možné, že ani rod *Trepomonas* nemusí být monofyletický, už je zajímavější. Nezávislý vznik kapsovitých cytostomů u diplomonád se nám sice zdá spíše nepravděpodobný, ale druh *Trepomonas rotans* se morfologicky tak výrazně odlišuje od zbytku trepomonád, že by nakonec mohlo teoreticky jít i o odlišný rod. Absence spirálního zakroucení buňky u tohoto rodu a silné předozadní zploštění společně s výraznými, otevřenými cytostomálními kapsami dávají buňkám unikátní vzhled a rovněž velmi charakteristický způsob pohybu. Na druhou stranu, ultrastrukturálně je *T. rotans* podobná ostatním trepomonádám, což by mluvilo pro monofylii tohoto rodu. Zajímavostí *T. rotans* jsou ovšem šupiny, které pokrývají celý povrch buňky kromě cytostomálních škvír. Tyto šupiny byly viditelné dokonce i na preparátech barvených protargolem, který u *T. rotans* silně obarvoval okraje buněk, což se u ostatních druhů trepomonád (které šupiny nemají) nedělo. Přítomnost šupin na membráně diplomonád a fornikát přinášíme v naší studii jako první (Mazancová et al., 2023). V rámci diplomonád zatím byla zaznamenána pouze jediná vzdálená podobnost tomuto jevu – takzvaná symetrická membrána u druhu *Trepomonas agilis* (Eyden & Vickermann, 1975), která rovněž pokrývá celou buňku kromě povrchu cytostomálních škvír. Existence unikátních šupin u *T. rotans* opět staví tento druh do pozice potenciálního nového rodu.

Vzhledem k tomu, že všichni zástupci rodu *Giardia* a *Spiroucleus* jsou endobiotičtí, se zdá nejpravděpodobnější varianta, že poslední společný předek skupiny Hexamitinae žil rovněž endobiotickým způsobem života. Nicméně, pokud to tak skutečně je, znamená to, že všechny volně žijící diplomonády musí být sekundárně volně žijící. Druhou možností je, že poslední společný předek byl volně žijící a jednotlivé linie rodu *Spiroucleus* a enteromonád pronikly do hostitelů nezávisle na sobě a rovněž nezávisle na endobiotických giardiích. První z těchto dvou hypotéz byla podpořena předešlými studiemi (například Xu et al., 2016). V každém případě je evoluce endobiotického způsobu života u diplomonád velmi zajímavá a neméně komplikovaná – volně žijící druhy se vyvinuly několikrát nezávisle na sobě z endobiotických předků, anebo naopak. Blízká příbuznost určitých endobiotických a volně žijících diplomonád – a to nejen v naší studii (Kolisko et al., 2008) – to jen potvrzuje. V naší studii jsme tento jev zaznamenali několikrát: linie *Trepomonas* sp. 1 izolovaná z broučí larvy je příbuzná volně žijícím trepomonádám. Endobiotický izolát *Hexamita* P11 se umístil k druhu

H. inflata, který je volně žijící. A rovněž volně žijící druh *Gyromonas ambulans* je blízce příbuzný zástupcům rodu *Trimitus*, kteří jsou endobiotičtí.

Evoluce morfologie buňky diplomonád je rovněž velice zajímavá. Diplomonády se vyvinuly z CLOs, z čehož vyplývá, že diplozoická morfologie buňky musí být odvozený stav. Nicméně, na samotné bázi fylogenetického stromu všech diplomonád se nenachází zástupci s unizoickou morfologií buňky, jak by se dalo předpokládat. Najdeme tam čistě diplozoické *Giardiinae* a vedle nich *Hexamitinae*, které jsou sice směsí unizoických a diplozoických zástupců, ale na bázi této skupiny jsou striktně diplozoičtí zástupci přinejmenším dvou linií rodu *Spironucleus* (např. Kolisko 2008). Diplozoické diplomonády tak mohly vzniknout vícekrát nezávisle na sobě, ale rovněž je také možné, že se unizoické diplomonády vyvinuly několikrát nezávisle na sobě z těch diplozoických. I v případě evoluce morfologie je zajímavá blízká příbuznost rodu *Trimitus* a *Gyromonas*, kde první zmíněný je unizoický a druhý diplozoický. Buď se tedy diplozoický rod *Gyromonas* vyvinul z unizoického předka, nebo se unizoický rod *Trimitus* vyvinul nějakým „rozdělením“ diplozoických buněk. Která z těchto možností je reálná nelze aktuálně určit. Je zřejmé, že změna morfologie směrem unizoické – diplozoické a naopak se v rámci skupiny *Hexamitinae* v evoluci stala vícekrát. Bez jakékoli nadsázky lze říct, že evoluce diplomonád byla opravdu pozoruhodný proces, který stojí za další vědeckou pozornost.

Závěr

Celkem bylo určeno 65 nových sekvencí genu pro SSU rRNA diplomonád ze skupiny Hexamitinae. V převážné většině se jednalo o volně žijící zástupce.

V souladu s předchozími studii vyšla skupina Hexamitinae v analýze monofyletická a v několika liniích se vyskytli blízce příbuzní volně žijící a endobiotičtí zástupci.

Unizoické diplomonády se rozdělily do několika separátních skupin, přičemž unizoickému rodu *Trimitus* byl blízce příbuzný diplozoický rod *Gyromonas*.

Rod *Hexamita* se rozpadl na čtyři nepřibuzné linie. Jedna z nich je potenciálně brakická nebo slanovodní.

Rod *Trepomonas* se rozpadl na dvě nepřibuzné linie. Jednu linii tvořil pouze druh *Trepomonas rotans*, ve druhé linii se nacházely všechny ostatní izoláty rodu *Trepomonas*.

Jednu skupinu izolátů rodu *Trepomonas* nebylo možné podle dostupné literatury určit do druhu.

Může se jednat o nové, dosud nepopsané druhy.

Podrobně jsme se zabývali morfologií druhů *Trepomonas agilis*, *T. latecapitata*, *T. rotans*, *T. steinii* a *Gyromonas ambulans*. Morfologie rodu *Hexamita* a *Trimitus* nebyla podrobně studována.

Pomocí elektronové mikroskopie byla poprvé studována ultrastruktura druhu *Trepomonas rotans*. Na povrchu buněk tohoto druhu byly odhaleny šupiny, které nemá žádný jiný zástupce řádu Diplomonadida.

Seznam použité literatury

Adam, R.D., 2017. Diplomonadida. In: Archibald, J.M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H., Margulis, L., Melkonian, M., Chapman, D.J., Corliss, J.O. (Eds.), Handbook of the Protists. Springer International Publishing AG, pp 1–28.

Brugerolle, G., 1975. Contribution a l'étude cytologique et phylétique des diplozoaires (Zoomastigophorea, Diplozoa, Dangeard 1910). VI. Caractères généraux des diplozoaires. Protistologica 11, 111–118.

Brugerolle, G., Müller, M., 2000. Amitochondriate flagellates. In: Leadbeater, B.S.C., Green, J.C. (Eds.), The Flagellates. Unity, Diversity and Evolution. Taylor & Francis Limited, London, pp. 166–185.

Cavalier-Smith, T., 2003. The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, *Carpodimonas*, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their evolutionary affinities and new higher taxa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53 (6), 1741–1758.

Cavalier-Smith, T., 2013. Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. Europ. J. Protistol. 49 (2), 115–178.

Desser, S.S., Hong, H., Siddall, M.E., Barta, J.R., 1993. An ultrastructural study of *Brugerolleia algonquinensis* gen. nov., sp. nov. (Diplomonadina; Diplomonadida), a flagellate parasite in the blood of frogs from Ontario, Canada. Eur. J. Protistol. 29 (1), 72–80.

Dujardin, F., 1841. Histoire naturelle des zoophytes. Infusoires, comprenant la physiologie et la classification de ces animaux, et la manière de les étudier à l'aide du microscope. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris.

Eyden, B.P., Vickerman, K., 1975. Ultrastructure and vacuolar movements in the freeliving diplomonad *Trepomonas agilis* Klebs. J. Protozool. 22 (1), 54–66.

Grassé, P.P., 1952. Classe des zooflagellés: Zooflagellata ou Zoomastigina (Euflagellata Claus 1887). In: Grassé, P.P. (Ed.), *Traité De Zoologie*. Paris.

Hampl, V., Horner, D.S., Dyal, P., Kulda, J., Flegr, J., Foster, P.G., Embley, T.M., 2005. Inference of the phylogenetic position of oxymonads based on nine genes: Support for Metamonada and Excavata. *Mol. Biol. Evol.* 22, 2508–2518.

Jelström-Hultqvist, J., Einarsson, E., Xu, F., Hjort, K., Ek, B., Steinhauf, D., Hultenby, K., Bergquist, J., Andersson, J.O., Svärd, S.G., 2013. Hydrogenosomes in the diplomonad *Spiroucleus salmonicida*. *Nat. Comm.* 4, 2493.

Jorgensen, A., Sterud, E., 2007. Phylogeny of *Spiroucleus* (Eopharyngia: Diplomonadida: Hexamitinae). *Protist* 158 (2), 247–254.

Klebs, G., 1892. Flagellatenstudien II. *Zeitschrift wissenschaftliche Zool.* 55, 329–350.

Kolisko, M., Cepicka, I., Hampl, V., Kulda, J., Flegr, J., 2005. The phylogenetic position of enteromonads: a challenge for the present models of diplomonad evolution. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1729–1733.

Kolisko, M., Cepicka, I., Hampl, V., Leigh, J., Roger, A.J., Kulda, J., Simpson, A.G.B., Flegr, J., 2008. Molecular phylogeny of diplomonads and enteromonads based on SSU rRNA, alpha-tubulin and HSP90 genes: Implications for the evolutionary history of the double karyomastigont of diplomonads. *BMC Evol. Biol.* 8, 205.

Kulda, J., Nohýnková, E., 1978. Flagellates of the human intestine and of intestines of other species. In: Kreier, J.P. (Ed.), *Parasitic Protozoa*, 2. Academic Press, New York, pp. 1–138.

Leger, M.M., Kolisko, M., Kamikawa, R., Stairs, C.W., Kume, K., Čepička, I., Silberman, J.D., Andersson, J.O., Xu, F., Yabuki, A., Eme, L., Zhang, Q., Takishita, K., Inagaki, Y., Simpson, A.G.B., Hashimoto, T., Roger, A.J., 2017. Organelles that illuminate the origins of *Trichomonas* hydrogenosomes and *Giardia* mitosomes. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 0092.

- Mazancová, E., Zadrobílková, E., Yubuki, N., Čepička, I., 2023. Phylogenetic and morphological diversity of free-living diplomonads. *Europ. J. Protistol.* 91, 126024.
- Millet, C.O.M., Williams, C.F., Hayes, A.J., Hann, A.C., Cable, J., Lloyd, D., 2013. Mitochondria-derived organelles in the diplomonad fish parasite *Spironucleus vortens*. *Exp. Parasitol.* 135 (2), 262–273.
- Mylnikov, A.P., 1985. A key to free-living flagellates of order Diplomonadida (Wenyon) Brugerolle. In: Jakovlev, V.N. (Ed.), *Aquatic Communities and Hydrobiont Biology*. Nauka, Leningrad, pp. 174–198.
- Roger, A.J., Svärd, S.G., Tovar, J., Clark, C.G., Smith, M.W., Gillin, F.D., Sogin, M.L., 1998. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: Evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *PNAS* 95, 229–234.
- Ruinen, J., 1938. Notizen über Salzflagellaten. II. Über die Verbreitung der Salzflagellaten. *Arch. Protistenk.* 90, 210–258.
- Seligo, A., 1886. Untersuchungen über Flagellaten. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 4, 145–179.
- Siddall, M.E., Hong, H., Desser, S.S., 1992. Phylogenetic analysis of the Diplomonadida (Wenyon, 1926) Brugerolle, 1975: Evidence for heterochrony in protozoa and against *Giardia lamblia* as a “missing link”. *J. Protozool.* 39, 361–367.
- Simpson, A.G.B., 2003. Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (6), 1759–1777.
- Skuja, H., 1956. Taxonomische und biologische Studien über das Phytoplankton schwedischer Binnengewässer. *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis ser. IV* 16 (3), 110–112.
- Tachezy, J., Sánchez, L.B., Müller, M., 2001. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1919–1928.

Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., Lucocq, J.M., 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426 (6963), 172–176.

Vargová, R., Hanousková, P., Salamonová, J., Žihala, D., Silberman, J.D., Eliáš, M., Čepička, I., 2022. Evidence for an independent hydrogenosome-to-mitosome transition in the CL3 lineage of fornicates. *Front. Microbiol.* 13, 866459.

Xu, F., Jelström-Hultquist, J., Kolisko, M., Simpson, A.G.B., Roger, A.J., Svärd, S.F., Andresson, J.O., 2016. On the reversibility of parasitism: adaptation to a free-living lifestyle via gene acquisitions in the diplomonad *Trepomonas* sp. PC1. *BMC Biol.* 14 (1), 77.

Yubuki, N., Zadrobílková, E., Čepička, I., 2017. Ultrastructure and molecular phylogeny of *Iotanema spirale* gen. nov. et sp. nov., a new lineage of endobiotic Fornicata with strikingly simplified ultrastructure. *J. Eukaryot. Microbiol.* 64 (4), 422–433.

Příloha

Mazancová, E., Zadrobílková, E., Yubuki, N., Čepička, I., 2023. Phylogenetic and morphological diversity of free-living diplomonads. *Europ. J. Protistol.* 91, 126024.