

Aims of Ph.D. thesis

- 1) Taxonomic revision of obligately anaerobic Heterolobosea; isolation and cultivation of new strains, their morphological characterization and description of new taxa
- 2) Utilization of existing and newly obtained SSU rDNA or protein-coding gene sequences to investigate phylogenetic relationships between anaerobic Heterolobosea
- 3) Characterization of the life cycle of anaerobic Heterolobosea
- 4) Characterization of the flagellar apparatus of selected lineages, unification of the terminology used for cytoskeletal elements
- 5) Study of mitochondrion-related organelles observed in anaerobic Heterolobosea using transmission electron microscopy

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Zoology**

Ph.D. study program: Zoology

Summary of the Ph.D. Thesis



Diversity and evolution of anaerobic heteroloboseans

Mgr. Tomáš Pánek

Supervisor: doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Prague (2015)

Pánek, T., Simpson, A.G.B., Hampl, V., Čepička, I. (2014b). *Creneis carolina* gen. et sp. nov. (Heterolobosea), a novel marine anaerobic protist with strikingly derived morphology and life cycle. *Protist* 165: 542-567.

Pánek, T., Táborský, P., Pachiadaki, M.P., Hroudová, M., Vlček, Č., Edgcomb, V.P., Čepička I. Combined culture-based and culture-independent approaches provide insights into diversity of jakobids, extremely plesiomorphic eukaryotic lineage. Prepared manuscript.

Park, J.S., Simpson, A.G.B. (2015). Diversity of heterotrophic protists from extremely hypersaline habitats. *Protist*, in press.

Park, J.S., Simpson, A.G.B., Lee, W.J., Cho, B.C. (2007). Ultrastructure and phylogenetic placement within Heterolobosea of the previously unclassified, extremely halophilic heterotrophic flagellate *Pleurostomum flabellatum* (Ruinen 1938). *Protist* 158: 397-413.

Rappé, M.S., Giovannoni, S.J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology* 57: 369-394.

Tomáš Pánek

CURRICULUM VITAE

ADDRESS: Department of Zoology
Faculty of Science
Charles University in Prague
Viničná 7, 128 44 Prague 2
Czech Republic

TELEPHONE: +420 221 951 873

E-MAIL: mistrpanek@seznam.cz

PERSONAL DATA:

Birth date: April 14, 1986
Birthplace: Prague, Czech Republic

EDUCATION:

2002 – 2006: Akademické gymnázium Štěpánská, Prague, Czech Rep.

2006 – 2009: Bachelor program: Biology
Supervisor: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Faculty of Science, Charles University in Prague

2009: **Bc.** (BSc.) in Biology (with honours)
Thesis: Heterolobosea – diversity and evolution

2009 – 2011: Master program: Biology
Supervisor: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Faculty of Science, Charles University in Prague

2011: **Mgr.** (MSc.) in Biology (with honours)
Thesis: Evolution of anaerobic Heterolobosea

Since 2011 Ph.D. program: Zoology
Supervisor: doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Faculty of Science, Charles University in Prague,
2013: Visiting student at laboratory of prof. Andrew Roger, PhD.
Dalhousie University, Halifax, NS, Canada

PROFESSION:

Since 2011 Researcher at the Department of Zoology, Faculty of Science, Charles
University in Prague, Czech Republic

AWARDS AND SCHOLARSHIPS:

2011 The Dean's award for the outstanding diploma thesis
Since 2011 Supporting talented PhD research students program scholarship

SOCIETY MEMBERSHIP

Since 2008 Czech Society for Parasitology
2012: Organizer of 42nd Protozoological Days
Since 2011 International Society of Protistologists
2011 – 2014: Student member of the Executive committee
2015: Member of the Nominating committee

References

- Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., Theroux, S. M., Palacios, C., Aguilera, A., Amils, R.** (2011). Microbial community structure across the tree of life in the extreme Rio Tinto. *The ISME Journal* 5: 42-50.
- Barberà, M.J., Ruiz-Trillo, I., Tufts, J.Y., Bery, A., Silberman, J.D., Roger, A.J.** (2010). *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) has a hydrogenosome with novel metabolic properties. *Eukaryotic Cell* 9: 1913-1924.
- Broers, C.A.M., Stumm, C.K., Vogels, G.D., Brugerolle, G.** (1990). *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., sp. nov., a free-living ameboflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *European Journal of Protistology* 25: 369-380.
- Broers, C.A.M., Meijers, H.H.M., Symens, J.C., Stumm, C.K., Vogels, G.D., Brugerolle, G.** (1993). Symbiotic association of *Psalteriomonas vulgaris* n. spec. with *Methanobacterium formicicum*. *European Journal of Protistology* 29: 98-105.
- de Graaf, R.M., Duarte, I., van Alen, T.A., Kuiper, J.W., Schotanus, K., Rosenberg, J., et al.** (2009). The hydrogenosomes of *Psalteriomonas lanterna*. *BMC Evolutionary Biology* 9: 287.
- Pham, V.H., Kim, J.** (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in biotechnology*, 30: 475-484.
- Pánek, T., Silberman, J.D., Yubuki, N., Leander, B.S., Cepicka, I.** (2012) Diversity, evolution and molecular systematics of the Psalteriomonadidae, the main lineage of anaerobic/microaerophilic heteroloboseans (Excavata: Discoba). *Protist* 163: 807-831.
- Pánek, T., Ptáčková, E., Čepička, I.** (2014a). Survey on diversity of marine/saline anaerobic Heterolobosea (Excavata: Discoba) with description of seven new species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 2280-2304.

Interestingly, culture-based approaches were able to detect 60 % of all revealed species of Stygiellidae. Therefore, the effectivity of culture-based methods in this case is higher than we would have expected from studies on bacteria, where only approximately 1 % of species is cultivable (Pham and Kim 2012; Rappé and Giovannoni 2003).

We must take into account that culture media and culture conditions used in our studies are suitable for growth of anaerobic species that do not need extreme levels of other environmental factors such as salinity, temperature or pH. As Heterolobosea are ecologically diverse group of eukaryotes, there might exist undiscovered obligately anaerobic lineages living in non-canonical anaerobic or microoxic habitats. In fact, we know two such lineages, *Pleurostomum flabellatum* and an environmental clade branching within the *Sawyeria-Psalteriomonas* lineage. The former species lives in hypersaline habitats (Park *et al.* 2007; Park and Simpson 2015), the latter was detected in an extremely acidic river (Amaral-Zettler *et al.* 2011).

Our research revised knowledge about the phylogeny and diversity of anaerobic heteroloboseans. We proposed a new overall classification of the Psalteriomonadidae and described the novel family Creneidae, another obligately anaerobic lineage of Heterolobosea. Because most heteroloboseans are thought to be aerobes with classical mitochondria and several heteroloboseid lineages are very probably facultatively anaerobic, Heterolobosea is a suitable model group for study of the evolution of anaerobiosis. *In silico* analysis of anaerobic energy metabolism indicates that some genes have been acquired by horizontal gene transfer independently in anaerobic heterolobosens (ACS), while some have been inherited from the common ancestor of the subphylum Tetramitida (PPDK, Ppi-PFK, [FeFe]-hydrogenase and its maturases).

INTERNATIONAL CONFERENCES (SPEAKER):

Pánek, T., Hampl, V., Ptackova, E., Silberman, J.D., Yubuki, N., Leander, B.S., Cepicka, I. (2011). The surprisingly diverse world of anaerobic Heterolobosea (Excavata). Joint Meeting of the Phycological Society of America, International Society of Protistologists & Northwest Algal Symposium, Seattle (USA).

Pánek, T., Hampl, V., Ptackova, E., Silberman, J.D., Yubuki, N., Leander, B.S., Cepicka, I. (2011). The evolution, diversity and biogeography of anaerobic Heterolobosea (Excavata). VI European Congress of Protistology, Berlin.

Pánek, T., Táborský, P., Čepička, I. (2012). New anaerobic member of the jakobid genus *Andalucia*. PROTIST 2012 (ISOP 62th and ISEP XIX), Oslo, Norway.

Pánek, T., Táborský, P., Hroudová, M., Vlček, Č., Čepička, I. (2013) Hidden diversity of anaerobic jakobids in marine and brackish sediments. ICOP XIV, Vancouver, Canada.

Pánek T., Simpson A.G.B, Hampl V., Hroudová M., Vlček Č., Čepička I. (2014). Creneidae fam. nov. – novel anaerobic lineage of Heterolobosea (Excavata) with unique cell structure and peculiar multiflagellate stage within the life cycle. Protist 2014, Banff, Canada.

PUBLICATIONS:

Pánek, T., Čepička, I. (2012). Diversity of Heterolobosea in: Caliskan M. (ed.) Genetic diversity in microorganisms, InTech.

***Pánek, T.**, Silberman, J.D., Yubuki, N., Leander, B.S., Cepicka, I. (2012) Diversity, evolution and molecular systematics of the Psalteriomonadidae, the main lineage of anaerobic/micro-aerophilic heteroloboseans (Excavata: Discoba). Protist 163: 807-831.

***Pánek, T.**, Ptáčková, E., Čepička, I. (2014a). Survey on diversity of marine/saline anaerobic Heterolobosea (Excavata: Discoba) with description of seven new species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64: 2280-2304.

***Pánek, T.**, Simpson, A.G.B., Hampl, V., Čepička, I. (2014b). *Creneis carolina* gen. et sp. nov. (Heterolobosea), a novel marine anaerobic protist with strikingly derived morphology and life cycle. *Protist* 165: 542-567.

Yubuki, N., **Pánek, T.**, Yabuki, A., Čepička, I., Takishita, K., Inagaki, Y., Leander, B.S. (2015). Morphological identities of two different marine stramenopile environmental sequence clades: *Bicosoeca kenaiensis* (Hilliard, 1971) and *Cantina marsupialis* (Larsen and Patterson, 1990) gen. nov., comb. nov. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62: 532-542.

Céza, V., **Pánek, T.**, Smejkalová, P., Čepička, I. (2015). Molecular and morphological diversity of the genus *Hypotrichomonas* (Parabasalia: Hypotrichomonadida), with descriptions of six new species. *European Journal of Protistology* 51: 158-172.

Zhang, Q., Táborský, P., Silberman, J., **Pánek, T.**, Čepička, I., Simpson, A.G.B. (2015) Marine isolates of *Trimastix marina* form a plesiomorphic deep-branching lineage within Preaxostyla, separate from other known trimastigids (*Paratrimastix* n. gen.). *Protist*, in press.

***Pánek, T.**, Táborský, P., Pachiadaki, M.P., Hroudová, M., Vlček, Č., Edgcomb, V.P., Čepička I. Combined culture-based and culture-independent approaches provide insights into diversity of jakobids, extremely plesiomorphic eukaryotic lineage. Manuscript prepared for submission.

We identified R2/I system in *Creneis carolina* thanks to following features: (1) R2 splits into two halves as in other eukaryotes; (2) root R2 is supported by latticework element that resembles an I fibre of other excavates; (3) root R2 is associated with a striated fibre that resembles rhizoplast of other heteroloboseans; (4) cytoplasmic side of R2 is underlain by interconnected spokes that have been observed also on the leftmost microtubules of the outer portion of R2 in some psalteriomonadids. The reversal of the chirality is indicated by positional characteristics as follows: (1) root R2 of *C. carolina* originates at the left side of the basal body, not at the right side; (2) the putative rhizoplast originates to the right of R2, not to the left as in comparable heteroloboseans; (3) it is the inner portion of the R2 ('R2a') that runs down the right side of the cell, whereas it is the outer portion of R2 that supports the right wall of the groove in psalteriomonadids and *Pleurostomum flabellatum*. Thus, the R2 of *Creneis* largely resembles the R2 of other heteroloboseans, except that is in mirror image.

As anaerobic heteroloboseans are only rarely reported in environmental surveys, estimation of their 'real' species diversity is impossible. However, our current study on the diversity of anaerobic jakobids (Excavata: Discoba) is a good guideline for answering the question about effectivity of the culture-based approach in revealing the species diversity of anaerobic excavates ([Pánek et al., prepared manuscript](#)).

Anaerobic jakobids are frequently detected in anoxic habitats by PCR-based, environmental studies. Our study used combined culture-based and culture-independent approaches to discover 'real' species diversity of jakobids in those habitats and showed that anaerobic members of this group constitute a clade, Stygiellidae, that comprises at least 10 species and ordinarily inhabits anoxic, sulfide- and ammonium-rich marine habitats worldwide.

* papers included into the Ph.D. thesis

sembled a discoidal crista (Pánek *et al.* 2014a). If this is true, MROs of *Pseudoharpagon pertyi* may represent a transition state between classical mitochondria of aerobic heteroloboseans and acristate MROs of other psalteriomonadids.

Besides, we have discovered and described obligately anaerobic *Creneis carolina* (Creneidae). *C. carolina* has a unique life cycle that is unlike that of other heteroloboseans, because it is the only known heterolobosean with permanent flagellum in the amoeboid stage. Interestingly, it is able to transform into a multiflagellate cell that is not particularly similar to any eukaryote that we are aware of (Pánek *et al.* 2014b).

Based on the cell structure and phylogenetic analyses of SSU rDNA, α -tubulin and β -tubulin genes, we proposed two hypotheses on the phylogenetic position of Creneidae: (1) Creneidae and Psalteriomonadidae are closely related to each other; (2) Creneidae is closely related to or branches within Percolatea (Pánek *et al.* 2014b). Recently, we have resolved the close relationship between Creneidae and Percolatea using multigene phylogenetic analyses based on up to 132 genes (Pánek *et al.*, unpublished). Therefore, obligate anaerobes evolved at least twice independently during the evolution of Heterolobosea. *Pleurostomum flabellatum* (Tulamoebidae) is probably the third such lineage, but its MROs have not been studied in detail (Park *et al.* 2007).

Ultrastructural study of *Creneis carolina* amoeboid cells showed that its single flagellum is homologous to the eldest flagellum of other eukaryotes. Its basal body anchors four non-microtubular elements and two microtubular roots – R1 and R2. The element herein named R2 and the whole R2/I system are highly similar to R2 and R2/I system of other Heterolobosea and eukaryotes. However, the whole flagellar apparatus or at least R2/I system of *C. carolina* may have undergone a reversal of chirality relative to the flagellum. Alternately, the chirality of the flagellum and basal body has become inverted. Both proposed scenarios indicate unprecedented evolutionary developmental changes.

Abstract

This thesis is focused on the phylogeny, diversity, and cell structure of obligately anaerobic Heterolobosea (Excavata: Discoba). Using culture-based approach, we have discovered their hidden species diversity and described 11 new species. Our phylogenetic analyses showed that obligately anaerobic heteroloboseans evolved at least twice independently (Creneidae and Psalteriomonadidae). Psalteriomonadidae is a major anaerobic lineage of Heterolobosea as it includes 16 species and 5 genera. Most psalteriomonadids have acristate mitochondria, although *Pseudoharpagon pertyi* probably possesses remnants of mitochondrial cristae. Creneidae are represented just by a single species, *Creneis carolina*, which displays unique cell structure and life cycle. Architecture of its flagellar apparatus is not readily comparable with any other eukaryotes, and at least some cytoskeletal elements have undergone unprecedented evolutionary positional changes. Anaerobic heteroloboseans are just rarely detected by environmental, culture-independent approaches. Thus, it is impossible to estimate their real species diversity. Nevertheless, our current data on anaerobic jakobids, another lineage of Discoba, indicates that the culture-based approach is relatively powerful to discover species diversity of anaerobic excavates. *In silico* analysis of anaerobic energy metabolism indicates that some genes have been acquired by horizontal gene transfer independently in anaerobic heterolobosens (ACS), while some have been inherited from the common ancestor of the subphylum Tetramitina (PPDK, Ppi-PFK, [FeFe]-hydrogenase, and its maturases).

Summary of Ph.D. thesis

During our work in the Laboratory of diversity and evolution of anaerobic protists, my colleagues and I have established a culture collection of anaerobic protists, which is most probably the largest and the most representative collection of its kind. Thus, it provides a unique insight into the world of anaerobic eukaryotes. Heterolobosea is one of amply represented groups in this collection, although they are just rarely reported from environmental, culture-independent studies from oxygen-poor habitats.

We have cultured 48 strains that covered overall diversity of anaerobic heteroloboseans deeper than any other study so far. We were able to examine four previously described species: *Percolomonas descissus*, *Psalteriomonas lanterna*, *Sawyeria marylandensis*, and *Monopylocystis visvesvarai*. Moreover, we have discovered and described eleven new species. We determined each species based on distinct morphology with respect to the placement in the SSU rDNA tree and genetic distances between individual strains.

Phylogenetic analysis of SSU rDNA clearly showed that vast majority of obligately anaerobic heteroloboseans belongs to a single lineage, Psalteriomonadidae. Originally, this family contained just a single species, *Psalteriomonas lanterna*. Currently, it comprises five genera – *Psalteriomonas*, *Sawyeria*, *Monopylocystis* and newly described genera *Harpagon* and *Pseudoharpagon* (Pánek *et al.* 2012). Genus *Harpagon* contains also *H. descissus* (syn. *Percolomonas descissus*), former member of Percolomonadidae. Our phylogenetic analyses also supported monophyly of all psalteriomonadid species and genera. However, statistical support for monophyly of the genus *Monopylocystis* was relatively low. Psalteriomonadidae splits into three lineages whose interrelationships remain unresolved: (1) *Sawyeria* and *Psalteriomonas*, (2) *Harpagon* and *Monopylocystis*, (3) *Pseudoharpagon* (Pánek *et al.* 2014a).

Using morphological criteria, we showed that *Psalteriomonas vulgaris* (syn. *Lyromonas vulgaris*; former member of Lyromonadidae) and *Vahlkampfia anaerobica* (former member of Vahlkampfiidae) also belong to this lineage (Pánek *et al.* 2012). Thus, Psalteriomonadidae currently includes 16 species (Pánek *et al.* 2014a).

Today, Psalteriomonadidae constitutes one of the most studied heteroloboseid families in terms of species diversity and number of known isolates. We showed that the last common ancestor of Psalteriomonadidae was able to form amoebae, flagellates, and cysts. The amoeboid stage probably plays crucial role in the life cycle of psalteriomonadids, because it is able to transform into flagellate or encyst. This type of life cycle is most probably ancestral for the entire phylum Heterolobosea, as only members of Percolatea are able to encyst in the flagellate stage. We observed some differences in the life cycle not only between species or genera but, more surprisingly, also between particular strains of a single species.

The flagellar apparatus of psalteriomonadids contains four flagella (Pánek *et al.* 2012), although flagellar apparatus of *Pseudoharpagon longus*, a newly described species, usually contains five of them (Pánek *et al.* 2014a). This is a rare in nature, flagellates with more than two flagella typically possess an even number of flagella.

We also examined mitochondrial derivatives (MROs) of psalteriomonadids using transmission electron microscopy. MROs morphology has been observed just in closely related genera *Psalteriomonas* and *Sawyeria* so far (Broers *et al.* 1990, 1993; Barbera *et al.* 2011). In both cases, MROs are acristate and display peculiar morphology. *Psalteriomonas* spp. possess two morphs of hydrogenosomes (Broers *et al.* 1990, 1993; de Graaf *et al.* 2009; Pánek *et al.* 2012), and *Sawyeria marylandensis* possesses cup-shaped MROs (Barberà *et al.* 2011). We showed that also MROs of *Monopylocystis visvesvarai* are acristate (Pánek *et al.* 2012). More importantly, MROs of *Pseudoharpagon pertyi* often contained a single membranous structure that closely re-

Cíle disertační práce

- 1) Provést taxonomickou revizi dosud známých anaerobních druhů řazených mezi Heterolobosea, získat nové izoláty anaerobních heteroloboseí, provést jejich základní morfologickou charakterizaci a popis nových taxonů.
- 2) Rozřešit příbuzenské vztahy mezi jednotlivými liniemi anaerobních heteroloboseí pomocí molekulárních markerů, zejména SSU rDNA.
- 3) Charakterizovat životní cyklus anaerobních heteroloboseí.
- 4) Charakterizovat struktury bičíkového aparátu reprezentativních zástupců jednotlivých anaerobních linií, sjednotit terminologii užívanou pro jednotlivé elementy tohoto aparátu u heteroloboseí.
- 5) Prozkoumat morfologii mitochondriálních derivátů anaerobních heteroloboseí pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie**

Doktorský studijní program: Zoologie

Autoreferát disertační práce



Diverzita a evoluce anaerobních heteroloboseí

Mgr. Tomáš Pánek

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

Praha (2015)

Pánek, T., Simpson, A.G.B., Hampl, V., Čepička, I. (2014b). *Creneis carolina* gen. et sp. nov. (Heterolobosea), a novel marine anaerobic protist with strikingly derived morphology and life cycle. *Protist* 165: 542-567.

Pánek, T., Táborský, P., Pachiadaki, M.P., Hroudová, M., Vlček, Č., Edgcomb, V.P., Čepička I. Combined culture-based and culture-independent approaches provide insights into diversity of jakobids, extremely plesiomorphic eukaryotic lineage. Prepared manuscript.

Park, J.S., Simpson, A.G.B. (2015). Diversity of heterotrophic protists from extremely hypersaline habitats. *Protist*, in press.

Park, J.S., Simpson, A.G.B., Lee, W.J., Cho, B.C. (2007). Ultrastructure and phylogenetic placement within Heterolobosea of the previously unclassified, extremely halophilic heterotrophic flagellate *Pleurostomum flabellatum* (Ruinen 1938). *Protist* 158: 397-413.

Rappé, M.S., Giovannoni, S.J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology* 57: 369-394.

Tomáš Pánek

CURRICULUM VITAE

ADRESA: Katedra zoologie
Přírodovědecká fakulta
Karlova univerzita v Praze
Viničná 7, 128 44 Praha 2
Česká republika

TELEFON: +420 221 951 873

E-MAIL: mistrpanek@seznam.cz

OSOBNÍ ÚDAJE:

Datum narození: 14. duben, 1986
Místo narození: Praha, Česká republika

VZDĚLÁNÍ:

2002 – 2006: Akademické gymnázium Štěpánská, Praha, Česká republika

2006 – 2009: Bakalářský studijní program: Biologie
Školitel: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

2009: Titul **bakalář** (dokončeno s vyznamenáním)
Bakalářská práce: Heterolobosea – diverzita a evoluce

2009 – 2011: Navazující magisterský studijní program: Biologie
Školitel: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

2011: Titul **magistr** (dokončeno s vyznamenáním)
Magisterská práce: Evoluce anaerobních heteroloboseí

Od 2011 Doktorský studijní program: Zoologie
 Školitel: doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.
 Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

2013: Stáž v laboratoři prof. Andrew Rogera, PhD.
 Dalhousie University, Halifax, NS, Kanada

ZAMĚSTNÁNÍ:

Od 2011 Vědecký pracovník na Katedře Zoologie
 Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

OCENĚNÍ A STIPENDIA:

2011 Cena děkana PŘF UK pro nejlepší magisterskou diplomovou práci

Od 2011 Stipendista programu STARS (Supporting Talented PhD Research Students)

ČLENSTVÍ V ODBORNÝCH SPOLEČNOSTECH

Od 2008 **Česká parazitologická společnost**
 2012: Hlavní organizátor 42. Protozoologických dnů

Od 2011 **International Society of Protistologists**
 2011 – 2014: Studentský zástupce ve výkonném výboru
 2015: Člen nominační komise

Reference

Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., Theroux, S. M., Palacios, C., Aguilera, A., Amils, R. (2011). Microbial community structure across the tree of life in the extreme Rio Tinto. *The ISME Journal* 5: 42-50.

Barberà, M.J., Ruiz-Trillo, I., Tufts, J.Y., Bery, A., Silberman, J.D., Roger, A.J. (2010). *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) has a hydrogenosome with novel metabolic properties. *Eukaryotic Cell* 9: 1913-1924.

Broers, C.A.M., Stumm, C.K., Vogels, G.D., Brugerolle, G. (1990). *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., sp. nov., a free-living ameboflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *European Journal of Protistology* 25: 369-380.

Broers, C.A.M., Meijers, H.H.M., Symens, J.C., Stumm, C.K., Vogels, G.D., Brugerolle, G. (1993). Symbiotic association of *Psalteriomonas vulgaris* n. spec. with *Methanobacterium formicicum*. *European Journal of Protistology* 29: 98-105.

de Graaf, R.M., Duarte, I., van Alen, T.A., Kuiper, J.W., Schotanus, K., Rosenberg, J., et al. (2009). The hydrogenosomes of *Psalteriomonas lanterna*. *BMC Evolutionary Biology* 9: 287.

Pham, V.H., Kim, J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in biotechno-logy*, 30: 475-484.

Pánek, T., Silberman, J.D., Yubuki, N., Leander, B.S., Cepicka, I. (2012) Diversity, evolution and molecular systematics of the Psalteriomonadidae, the main lineage of anaerobic/microaerophilic heteroloboseans (Excavata: Discoba). *Protist* 163: 807-831.

Pánek, T., Ptáčková, E., Čepička, I. (2014a). Survey on diversity of marine/saline anaerobic Heterolobosea (Excavata: Discoba) with description of seven new species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 2280-2304.

Je zajímavé, že kultivační přístup byl schopen detekovat 60 % všech známých druhů skupiny Stygiellidae. Efektivita kultivačních metod je tak v tomto případě vyšší, než bychom čekali při znalosti výsledků studií u prokaryot, kde je jen zhruba 1 % druhů kultivovatelných (Pham and Kim 2012; Rappé and Giovannoni 2003).

Musíme také vzít v úvahu, že živná média a kultivační podmínky použité v našich studiích jsou vhodné pro pěstování anaerobních druhů, které nevyžadují extrémní hladinu jiných environmentálních faktorů (salinita, teplota, pH). Protože jsou Heterolobosea ekologicky rozmanitou skupinou eukaryot, lze předpokládat, že právě v podobně extrémních prostředích stále existují neobjevené obligátně anaerobní linie. O některých z nich dokonce existují už dnes doklady - *Pleurostomum flabellatum* a environmentální linie příbuzná rodu *Sawyeria* a *Psalteriomonas*. *P. flabellatum* obývá hypersalinní habitáty (Park *et al.* 2007; Park and Simpson 2015), zmiňovaná environmentální linie byla detekována v extrémně kyselém prostředí (Amaral-Zettler *et al.* 2011).

Během našeho výzkumu jsme revidovali znalosti o fylogenezi a diverzitě anaerobních heteroloboseí. Navrhli jsme novou klasifikaci Psalteriomonadidae a popsali jsme novou čeleď Creneidae, nezávislou obligátně anaerobní linií heteroloboseí. Protože řada heteroloboseí jsou aerobové s klasickými mitochondriemi a několik linií je pravděpodobně fakultativně anaerobních, jsou Heterolobosea vhodnou modelovou skupinou pro studium evoluce anaerobiózy. *In silico* analýza anaerobního energetického metabolismu naznačuje, že některé geny byly získány u anaerobních heteroloboseí nezávisle pomocí horizontálního genového přenosu (např. ACS), zatímco jiné byly zděděny od společného předka podkmene Tetramitia (PPDK, Ppi-PFK, [FeFe]-hydrogenáza a její maturázy).

MEZINÁRODNÍ KONFERENCE (PŘEDNÁŠEJÍCÍ):

Pánek, T., Hampl, V., Ptackova, E., Silberman, J.D., Yubuki, N., Leander, B.S., Cepicka, I. (2011). The surprisingly diverse world of anaerobic Heterolobosea (Excavata). Joint Meeting of the Phycological Society of America, International Society of Protistologists & Northwest Algal Symposium, Seattle (USA).

Pánek, T., Hampl, V., Ptackova, E., Silberman, J.D., Yubuki, N., Leander, B.S., Cepicka, I. (2011). The evolution, diversity and biogeography of anaerobic Heterolobosea (Excavata). VI European Congress of Protistology, Berlin.

Pánek, T., Táborský, P., Čepička, I. (2012). New anaerobic member of the jakobid genus *Andalucia*. PROTIST 2012 (ISOP 62th and ISEP XIX), Oslo, Norway.

Pánek, T., Táborský, P., Hroudová, M., Vlček, Č., Čepička, I. (2013) Hidden diversity of anaerobic jakobids in marine and brackish sediments. ICOP XIV, Vancouver, Canada.

Pánek T., Simpson A.G.B, Hampl V., Hroudová M., Vlček Č., Čepička I. (2014). Creneidae fam. nov. – novel anaerobic lineage of Heterolobosea (Excavata) with unique cell structure and peculiar multiflagellate stage within the life cycle. Protist 2014, Banff, Canada.

PUBLIKACE:

Pánek, T., Čepička, I. (2012). Diversity of Heterolobosea in: Caliskan M. (ed.) Genetic diversity in microorganisms, InTech.

***Pánek, T.,** Silberman, J.D., Yubuki, N., Leander, B.S., Cepicka, I. (2012) Diversity, evolution and molecular systematics of the Psalteriomonadidae, the main lineage of anaerobic/micro-aerophilic heteroloboseans (Excavata: Discoba). Protist 163: 807-831.

***Pánek, T.,** Ptáčková, E., Čepička, I. (2014a). Survey on diversity of marine/saline anaerobic Heterolobosea (Excavata: Discoba) with description of seven new species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64: 2280-2304.

***Pánek, T.**, Simpson, A.G.B., Hampl, V., Čepička, I. (2014b). *Creneis carolina* gen. et sp. nov. (Heterolobosea), a novel marine anaerobic protist with strikingly derived morphology and life cycle. *Protist* 165: 542-567.

Yubuki, N., **Pánek, T.**, Yabuki, A., Čepička, I., Takishita, K., Inagaki, Y., Leander, B.S. (2015). Morphological identities of two different marine stramenopile environmental sequence clades: *Bicosoeca kenaiensis* (Hilliard, 1971) and *Cantina marsupialis* (Larsen and Patterson, 1990) gen. nov., comb. nov. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62: 532-542.

Céza, V., **Pánek, T.**, Smejkalová, P., Čepička, I. (2015). Molecular and morphological diversity of the genus *Hypotrichomonas* (Parabasalia: Hypotrichomonadida), with descriptions of six new species. *European Journal of Protistology* 51: 158-172.

Zhang, Q., Táborský, P., Silberman, J., **Pánek, T.**, Čepička, I., Simpson, A.G.B. (2015) Marine isolates of *Trimastix marina* form a plesiomorphic deep-branching lineage within Preaxostyla, separate from other known trimastigids (*Paratrimastix* n. gen.). *Protist*, v tisku.

***Pánek, T.**, Táborský, P., Pachiadaki, M.P., Hroudová, M., Vlček, Č., Edgcomb, V.P., Čepička I. Combined culture-based and culture-independent approaches provide insights into diversity of jakobids, extremely plesiomorphic eukaryotic lineage. *Rukopis připraven k zaslání do tisku.*

R2/I systém u *Creneis carolina* jsme identifikovali díky následujícím znakům: (1) R2 se rozděluje do dvou částí podobně jako u jiných eukaryot; (2) kořen R2 je podporován strukturou velmi připomínající I fibrilu jiných exkavát; (3) kořen R2 se spojuje s žíhanou fibrilou připomínající rhizoplast jiných heteroloboseí; (4) cytoplasmatická strana R2 je podložena vzájemně spojenými paprskovitými útvary, které byly pozorovány na mikrotubulech vnější části R2 u Psalteriomonadidae. Reverze chiralit je naopak indikována pozičními charakteristikami: (1) kořen R2 u *C. carolina* začíná na levé straně bazálního tělíska; (2) rhizoplast začíná na pravé straně R2, nikoliv na levé jako u jiných heteroloboseí; (3) je to vnitřní část R2 ('R2a'), která podporuje pravou stranu buňky, zatímco u zástupců Psalteriomonadidae a u druhu *Pleurostomum flabellatum* podporuje pravou stranu exkavátní rýhy vnější část R2. Lze tedy shrnout, že R2 nalezené u *Creneis carolina* velmi připomíná R2 jiných heteroloboseí, pokud připustíme, že je jeho zrcadlovým obrazem.

Protože jsou anaerobní zástupci kmene Heterolobosea jen vzácně detekováni v environmentálních studiích, je odhad jejich „skutečné“ druhové diverzity nesmírně obtížný. Naše nová studie zaměřující se na diverzitu anaerobních jakobidů (Excavata: Discoba) nicméně poskytuje dobré vodítko pro zodpovězení otázky týkající se efektivity kultivačních přístupů v odhalování druhové diverzity anaerobních exkavát (**Pánek et al.**, rukopis připraven k zaslání do tisku).

Anaerobní jakobidi jsou totiž často detekováni v anoxických habitatech pomocí environmentálních přístupů. Naše studie kombinuje ve snaze odhalit diverzitu anaerobních jakobidů tato data s výsledky získanými nově s použitím kultivačního přístupu. Ukazuje se, že anaerobní jakobidi tvoří monofylum, Stygiellidae, které obsahuje nejméně 10 druhů běžně obývajících anoxické, na sulfan a amoniak bohaté mořské sedimenty celého světa.

jsou akristátní (Pánek *et al.* 2012) a MROs druhu *Pseudoharpagon pertyi* často obsahují vnitřní membránovou strukturu velmi připomínající diskoidální kristu (Pánek *et al.* 2014a). Pokud je to pravda, pak MROs nalezené u *Pseudoharpagon pertyi* mohou reprezentovat přechodný stav mezi klasickými mitochondriemi aerobních heteroloboseí a akristátními MROs ostatních druhů čeledi Psalteriomonadidae.

Kromě toho jsme objevili a popsali obligátně anaerobní druh *Creneis carolina* (Creneidae). *C. carolina* má unikátní životní cyklus, který se dosti liší od ostatních heteroloboseí. Je jediným zástupcem heteroloboseí s bičíkem trvale přítomným i v améboidním stadiu. Navíc jsou buňky tohoto druhu schopny transformace do dalšího neobvyklého stádia, bizarního mnohobičíkovce (Pánek *et al.* 2014b).

S pomocí dat o buněčné struktuře a na základě výsledků fylogenetických analýz SSU rDNA a genů pro α -tubulin a β -tubulin jsme navrhli dvě hypotézy o fylogenetické pozici Creneidae: (1) Creneidae a Psalteriomonadidae jsou blízce příbuzné linie; (2) Creneidae je blízce příbuzná skupině Percolatea (Pánek *et al.* 2014b). Nedávno jsme pak potvrdili druhou z těchto hypotéz prostřednictvím multigenových fylogenetických analýz založených až na 132 genech (Pánek *et al.*, nepubl.). Díky tomu je jasné, že obligátně anaerobní linie se uvnitř skupiny Heterolobosea vyvinuly nejméně dvakrát nezávisle na sobě. *Pleurostomum flabellatum* (Tulamoebidae) je pravděpodobně třetí takovou linií, ale jeho MROs nebyly dosud detailně studovány (Park *et al.* 2007).

Ultrastrukturní studie améboidní buňky *Creneis carolina* ukázala, že její bičík je homologický k nejstaršímu bičíku ostatních eukaryot. Jeho bazální tělísko kotví čtyři nemikrotubulární elementy a dva mikrotubulární kořeny – R1 a R2. Nejen struktura označená u *C. carolina* jako R2, ale celý R2/I systém tohoto druhu je velmi podobný tomu, co pozorujeme u jiných heteroloboseí a u zbytku eukaryot. Na druhou stranu se zdá, že celý bičíkový aparát nebo alespoň R2/I systém *C. carolina* prošel reverzí chiralidy vzhledem k bičíku. Alternativně mohlo dojít k inverzi chiralidy u tohoto bičíku.

Abstrakt

Tato práce se zaměřuje na fylogenezi, diverzitu a buněčnou strukturu obligátně anaerobních zástupců kmene Heterolobosea (Excavata: Discoba). S použitím kultivačních přístupů odhaluje jejich skrytou druhovou diverzitu a prezentuje 11 nově popsaných druhů. Pomocí fylogenetických analýz ukazuje, že obligátně anaerobní linie heteroloboseí se vyvinuly nejméně dvakrát nezávisle na sobě (Creneidae a Psalteriomonadidae). Čleď Psalteriomonadidae je možno označit za hlavní anaerobní linii skupiny Heterolobosea, neboť obsahuje drtivou většinu známých obligátně anaerobních zástupců (16 druhů a 5 rodů). Většina druhů skupiny Psalteriomonadidae má akristátní mitochondrie, ačkoliv *Pseudoharpagon pertyi* má zřejmě zachovány ještě zbytky mitochondriálních krist. Buněčná struktura a životní cyklus *Creneis carolina*, samostatné anaerobní linie blízce příbuzné linii Percolatea, je unikátní. Architektura jejího bičíkového aparátu není jednoduše porovnatelná s jinými eukaryoty, neboť u *C. carolina* došlo k jedinečným přeskupením cytoskeletárních elementů. Anaerobní Heterolobosea jsou jen vzácně detekována pomocí environmentálních, na kultivaci nezávislých metod. Z toho důvodu je velmi obtížné odhadovat jejich skutečnou druhovou diverzitu. Naše nejnovější data o anaerobních jakobidech, další linii patřící mezi Discoba, nicméně indikují, že kultivační přístup je poměrně úspěšný v odhalování druhové diverzity anaerobních exkavát. *In silico* analýza anaerobního energetického metabolismu naznačuje, že některé geny byly u anaerobních heteroloboseí získány horizontálním genovým přenosem nezávisle na sobě (ACS), zatímco některé další byly zděděny od společného předka podkmene Tetramitia (PPDK, Ppi-PFK, [FeFe]-hydrogenáza a její maturázy).

Shrnutí disertační práce

Během naší práce v Laboratoři diverzity a evoluce anaerobních protist jsme já a moji kolegové založili sbírku kultur anaerobních prvoků, která je největší a nejvíce reprezentativní sbírkou svého druhu na světě. Poskytuje tak jedinečný vhled do světa anaerobních eukaryot. Jednou z hojně zastoupených skupin v této sbírce je kmen Heterolobosea, ačkoliv jeho zástupci jsou jen velmi vzácně detekováni z prostředí chudých kyslíkem pomocí environmentálních, na kultivaci nezávislých metod.

Celkem se nám podařilo kultivovat 48 izolátů reprezentujících celkovou diverzitu anaerobních heteroloboseí lépe než předchozí studie. Znovu jsme získali a prozkoumali čtyři dříve popsané druhy: *Percolomonas descissus*, *Psalteriomonas lanterna*, *Sawyeria marylandensis* a *Monopylocystis visvesvarai*. Navíc jsme objevili a popsali 11 nových druhů. Každý z nich jsme rozlišili pomocí morfologických znaků, přičemž jsme brali v úvahu také znalost jejich fylogenetického postavení v analýze SSU rDNA a genetické distance mezi druhy a izoláty počítané ze sekvencí SSU rDNA.

Fylogenetická analýza SSU rDNA jasně ukázala, že naprostá většina obligátně anaerobních heteroloboseí patří do jedné linie, Psalteriomonadidae. Původně tato skupina zahrnovala pouze druh *Psalteriomonas lanterna*. V současnosti obsahuje pět rodů – *Psalteriomonas*, *Sawyeria*, *Monopylocystis*, *Harpagon* a *Pseudoharpagon* (poslední dva jsou nově popsány - [Pánek et al. 2012](#)). Do rodu *Harpagon* patří mimo jiné i *H. descissus* (syn. *Percolomonas descissus*), dříve řazený mezi Percolomonadidae. Monofylii všech druhů a téměř všech rodů skupiny Psalteriomonadidae podporuje i fylogenetická analýza SSU rDNA. Pouze statistická podpora monofylie rodu *Monopylocystis* je relativně nízká. Psalteriomonadidae se v této analýze rozpadají na tři linie, jejichž vzájemné příbuzenské vztahy zůstávají nejasné: (1) *Sawyeria* a *Psalteriomonas*, (2) *Harpagon* a *Monopylocystis*, (3) *Pseudoharpagon* ([Pánek et al. 2014a](#)).

Pomocí porovnání dostupných morfologických dat jsme ukázali, že *Psalteriomonas vulgaris* (syn. *Lyromonas vulgaris*; dříve Lyromonadidae) a *Monopylocystis anaerobica* (syn. *Vahlkampfia anaerobica*; dříve Vahlkampfiidae) také patří mezi Psalteriomonadidae ([Pánek et al. 2012](#)). Celkově tedy tato čeleď v současnosti obsahuje 16 druhů ([Pánek et al. 2014a](#)).

Dnes jsou Psalteriomonadidae jednou z nejvíce prostudovaných čeledí kmene Heterolobosea pokud jde o druhovou diverzitu a počet známých izolátů. Díky tomu jsme mohli ukázat, že jejich poslední společný předek byl schopen tvorby stádia améby, bičíkovce i cysty. Améboidní stádium pravděpodobně v životním cyklu zástupců této skupiny hraje klíčovou roli, protože je schopno transformace na bičíkovce i encystace. Tento typ životního cyklu je zřejmě ancestrální pro celý kmen Heterolobosea, neboť pouze členové skupiny Percolatea jsou schopni encystace v bičíkatém stádiu. My jsme pozorovali rozdíly v životním cyklu nejen mezi jednotlivými druhy nebo rody, ale dokonce i mezi jednotlivými izoláty jednoho druhu pěstované ve stejném živném médiu.

Bičíkový aparát skupiny Psalteriomonadidae obsahuje čtyři bičíky ([Pánek et al. 2012](#)), ačkoliv v případě nově popsaného druhu *Pseudoharpagon longus* obvykle nese bičíků pět ([Pánek et al. 2014a](#)). To je v přírodě vzácný stav, neboť bičíkovci s více než dvěma bičíky jich zpravidla mají sudý počet.

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie jsme u různých zástupců Psalteriomonadidae prozkoumali strukturu mitochondriálních derivátů (MROs), neboť dosud existovala podrobná data pouze z blízkce příbuzných rodů *Psalteriomonas* a *Sawyeria* (Broers et al. 1990, 1993; Barberà et al. 2011). V obou případech chybí mitochondriální krysty a MROs vykazují neobvyklou morfologii. *Psalteriomonas* spp. obsahují dvě morfologické varianty hydrogenosomů (Broers et al. 1990, 1993; de Graaf et al. 2009; [Pánek et al. 2012](#)) a *Sawyeria marylandensis* má pohárkovité MROs (Barberà et al. 2011). My jsme ukázali, že také MROs u *Monopylocystis visvesvarai*