

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Protistologie

Studijní obor: Protistologie



Bc. Martina Foučková

Methanogenní symbionti u zástupců čeledi Psalteriomonadidae
(Heterolobosea: Tetramitia)

Methanogenic symbionts of Psalteriomonadidae (Heterolobosea: Tetramitia)

Diplomová práce

Školitel:

prof. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2022

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.

V Praze, 25. 4. 2022

Martina Foučková

Poděkování

Ráda bych poděkovala zejména svému školiteli prof. RNDr. Ivanu Čepičkovi, PhD za zasvěcení do oboru, za vedení této práce a za neúnavné poskytování rad.

Také bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z týmu Ivana Čepičky, kteří mě učili nové metody, poskytovali cenné rady a vytvářeli příjemné a podnětné pracovní prostředí, zejména pak M.Sc. Danielu Méndez-Sánchezovi (thank you Daniel!).

Dále děkuji kolegům, kteří mi věnovali zajímavé izoláty, které byly pro tuto práci zásadní.

A nakonec děkuji Denise Foučkové, DiS a Williamu Bourlandovi, M.D. (thank you Bill!) za korekturu této práce.

Děkuji!

Abstrakt

Psalteriomonadidae je malá čeleď anaerobních amoéboflagelátů z kmene Heterolobosea, do které se řadí 16 popsáných a 17 dosud nepopsáných druhů. V návaznosti na anaerobní způsob života došlo u zástupců této čeledi k transformaci mitochondrií na vodík produkující hydrogenosomy. U tří druhů čeledi *Psalteriomonadidae* – *Psalteriomonas lanterna*, *P. vulgaris* a *P. magna* – byly v minulosti pozorovány symbiózy s prokaryotickými organismy. U druhu *P. lanterna* a *P. vulgaris* byli symbionti na základě morfologie a biochemických vlastností určeni jako *Methanobacterium formicicum*. V rámci této práce bylo získáno a osekvenováno 37 nových izolátů představujících sladkovodní zástupce této čeledi, dva z nových izolátů pravděpodobně představují dosud neobjevené druhy. Prokaryotičtí symbionti byli na základě autofluorescence identifikováni jako zástupci methanogenních archaea. Sekvenací genu pro 16S rRNA byli symbionti u všech hostitelů určeni jako druh rodu *Methanoregula*. Symbionti byli rozděleni do deseti skupin představujících jednotlivé genotypy. Při porovnání fylogenetických stromů vytvořených z izolátů hostitelů a jejich symbiontů je u některých genotypů patrná hostitelská specifita. U tří studovaných izolátů druhu *Sawyeria marylandensis* a tří izolátů zástupců rodu *Harpagon* žádní methanogenní symbionti nebyli detekováni. Největší pozornost byla věnována druhu *P. lanterna*, který byl na základě genetické variability a přítomnosti symbiontů s unikátními genotypy rozdělen na čtyři genetické linie. V rámci jednotlivých linií byla zdokumentována morfologie měňavek. U čtyř izolátů byla zdokumentována morfologie vzácnější formy bičíkovce a byly na nich otestovány dva způsoby barvení protargolem.

Klíčová slova: anaerobní protista, methanogeneze, methanogenní Archaea, endosymbióza

Abstract

Psalteriomonadidae is a small family of anaerobic amoeboflagellates belonging to Heterolobosea. So far, 16 species have been described and there are also at least another 17 putative species which are yet to be formally described. Their anaerobic lifestyle is associated with a modification of the mitochondria into hydrogen-producing hydrogenosomes. The main focus of this thesis is on methanogenic symbionts of this family. The presence of prokaryotic symbionts has been observed in three species of *Psalteriomonas*, namely *P. lanterna*, *P. vulgaris* and *P. magna*. In *P. lanterna*, and *P. vulgaris* the symbionts were identified as *Methanobacterium formicicum* on the basis of their morphology and biochemical properties. For this thesis, 37 new freshwater isolates of psalteriomonadids were collected, identified, sequenced, and together with older isolates in culture, were investigated for the presence of prokaryotic symbionts. The UV autofluorescence of the symbionts of *P. lanterna*, *P. magna* and *Psalteriomonadidae* sp. 5 indicates that they are methanogenic Archaea. No traces of methanogens were found in three isolates of *Sawyeria marylandensis* and three isolates of different *Harpagon* species. The symbionts were identified as *Methanoregula* sp. based on the 16S rRNA gene sequence. The symbionts were divided into ten groups, each representing unique genotype. A comparison between the phylogenetic tree of symbiont genotypes with that of their hosts is consistent with notable host specificity. Two of the 37 psalteriomonadid strains sequenced represent new species. Host morphologic and phylogenetic studies focused mainly on the most abundant species, *P. lanterna*. This species was divided into four genetic lineages, based on their 18S rRNA gene sequences and their unique symbiont genotypes. The in vivo morphology of the amoeba form was documented for each of the *P. lanterna* lineages. In four of the strains morphology of the rarer flagellate form was documented by light microscopy, both in vivo and using two different protargol staining methods.

Key words: anaerobic protists, methanogenesis, methanogenic Archaea, endosymbiosis

Obsah

1. Úvod a cíle	7
2. Literární přehled.....	9
2.1 Kmen Heterolobosea.....	9
2.2 Charakteristika čeledi Psalteriomonadidae	13
2.3 Diverzita čeledi Psalteriomonadidae	15
2.4 Endosymbióza anaerobních protist a methanogenních archeí.....	21
2.4.1 Methanogeneze.....	21
2.4.2 Methanogenní archaea.....	21
3. Materiál a metodika.....	26
3.1 Sběr vzorků, kultivace	26
3.1.1 Příprava kultivačních médií.....	26
3.2 Vybírání a vymývání jednotlivých buněk.....	26
3.3 Izolace DNA	27
3.4 Amplifikace genů pro 16S a 18S rRNA	27
3.5 Purifikace PCR produktu	28
3.6 Sekvenace DNA.....	28
3.7 Fylogenetická analýza.....	28
3.8 Morfologie	29
3.8.1 Barvení buněk protargolem podle Nie, 1950.....	30
3.8.2 Barvení buněk protargolem podle Foissner, 2014.....	31
3.9 Fluorescenční mikroskopie	31
4. Výsledky.....	32
4.1 Nové izoláty psalteriomonád	32
4.2 Morfologie měňavek a bičíkoviců	35
4.3 Identifikace methanogenních symbiontů	40
4.4 Fylogenetické analýzy	43
4.4.1 Hostitelé – čeleď Psalteriomonadidae	43
4.4.2 Methanogenní symbionti psalteriomonád	49
4.5 Specifita symbiontů a hostitelů.....	52
5. Diskuze.....	54
5.1 Nové izoláty čeledi Psalteriomonadidae.....	54
5.2 Diverzita v rámci druhu <i>Psalteriomonas lanterna</i>	55
5.3 Methanogenní symbionti psalteriomonád.....	57
6. Shrnutí.....	61
7. Literatura	62

1. Úvod a cíle

Anaerobní protisti velmi rozmanití a rozšíření, přesto jsou ale v porovnání s těmi aerobními, studovány jen velmi málo. Pro život v anoxickém prostředí si zde žijící eukaryotické organismy přizpůsobily energetický metabolismus a došlo u nich k přeměně klasických, kyslík využívajících mitochondrií na jejich deriváty, jako jsou například vodík a acetát produkující hydrogenozomy. Právě díky existenci hydrogenozomů mohly vzniknout syntrofické mutualistické endosymbiózy některých volně žijících protist a methanogenních prokaryot z domény Archaea. V tomto soužití methanogenní symbiont zpracovává vodík a možná i další produkty metabolismu hydrogenozomů hostitelské buňky za vzniku methanu. Tato symbióza je známá právě i některých zástupců čeledi Psalteriomonadidae. Čleď Psalteriomonadidae (v této práci bude používán český ekvivalent psalteriomonády) je evoluční linie volně žijících anaerobních protist patřící do kmene Heterolobosea. Je to relativně malá skupina, v současné době se do ní řadí pouze 16 popsáných druhů a je známý přibližně stejný počet dosud nepopsáných druhů. Ale stejně jako je málo pozornosti věnováno samotným psalteriomonádám, opomíjené je i studium jejich symbiontů. Dosud byli symbionti pozorováni u druhu *Psalteriomonas magna*, *P. vulgaris* a u druhu *P. lanterna*, kde byli identifikováni jako zástupci rodu *Methanobacterium*.

Cíle této práce jsou:

- (1) Identifikovat endosymbionty vyskytující se u druhu *Psalteriomonas lanterna*, kteří byli dosud studováni pouze na základě morfologie, sekvenací jejich genu pro 16S rRNA, popsat jejich genetickou diverzitu v rámci jednotlivých linií, a odhalit případné rozdíly v symbiontech mezi těmito liniemi.
- (2) Prozkoumat možnost symbiózy s methanogeny i u dalších zástupců čeledi Psalteriomonadidae dostupných v laboratorní kultuře, zejména u druhů *Psalteriomonas magna* a *Sawyeria marylandensis*, které jsou blízce příbuzné druhu *P. lanterna*. V buňkách druhu *P. magna* byly v minulosti pozorované buňky prokaryot nacházející se v blízkosti hydrogenozomů, je tedy možné, že by se také mohlo jednat o methanogenní archea. U druhu *S. marylandensis*, jehož hydrogenozomy v buňce tvoří neobvyklý miskovitý tvar, dosud žádní symbionti zaznamenání nebyli.

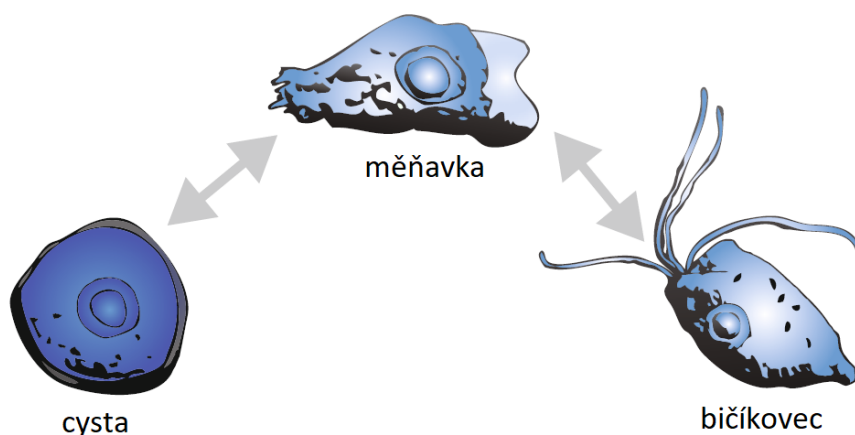
- (3) Získat nové izoláty a rozšířit tak dosud známou genetickou diverzitu malé čeledi Psalteriomonadidae, a to zejména v rámci sladkovodních rodů *Psalteriomonas* a *Harpagon*.
- (4) Porovnat morfologii velikostně velmi variabilních měňavek druhu *P. lanterna* a prozkoumat morfologii jejich méně časté a dosud málo studované formy bičíkovce.

2. Literární přehled

2.1 Kmen Heterolobosea

Heterolobosea je kmen heterotrofních protist patřících společně se skupinami Jakobida, Euglenozoa a rodem *Tsukubamonas* do linie Discoba v rámci superskupiny Excavata (Adl et al., 2019). Kmen Heterolobosea je známý hlavně díky druhu *Naegleria fowleri*, který může u lidí způsobit primární amébovou meningoencefalitidu (Carter, 1970).

Zástupci kmene Heterolobosea jsou v původním stavu améboflageláti, kteří v rámci svého životního cyklu střídají formu bičíkovce a měňavky, také mohou tvořit rezistentní cysty (obr. 1). U některých zástupců ale došlo k redukci některé z těchto forem a stabilně tvoří pouze jednu nebo dvě z nich. Příkladem jsou druhy rodů *Vahlkampfia* a *Selenaion*, jejichž zástupci se vyskytují pouze ve formě améby a cysty a rodů *Harpagon*, *Dactylomonas* nebo druh *Psalteriomonas vulgaris*, které tvoří pouze bičíkovce (Page 1967; Broers et al., 1993; Park et al., 2012; Pánek et al., 2014a; Hanousková et al., 2019). Buňky měňavek jsou si mezi jednotlivými skupinami morfologicky velmi podobné, liší se hlavně svojí velikostí. Při aktivní jednosměrné lokomoci obvykle mají slimákovitý („limax“) vzhled a pohybují se relativně rychle pomocí erupčních lobopodií. Na konci buňky se může být vytvořen uroid, ze kterého někdy vycházejí dlouhé filamenty (Pánek & Čepička, 2012). Měňavky úplně postrádají bičíkový aparát, při transformaci z měňavky na bičíkovce si buňky musejí celý bičíkový cytoskelet vytvořit *de novo*. Tento proces byl studován například u druhu *Naegleria gruberi*, kde došlo k vytvoření celého bičíkového aparátu pouze během přibližně dvou hodin (např. Lee, 2010). Do kmene Heterolobosea se mimo jiné řadí i rod *Acrasis*, který, jako jediný zástupce superskupiny Excavata je v rámci svého životního cyklu schopný tvořit mnohobuněčné plodničky (Brown et al., 2010).



Obr. 1: Střídání formy měňavky, bičíkovce a cysty v rámci životního cyklu (upraveno podle Pánek et al., 2016).

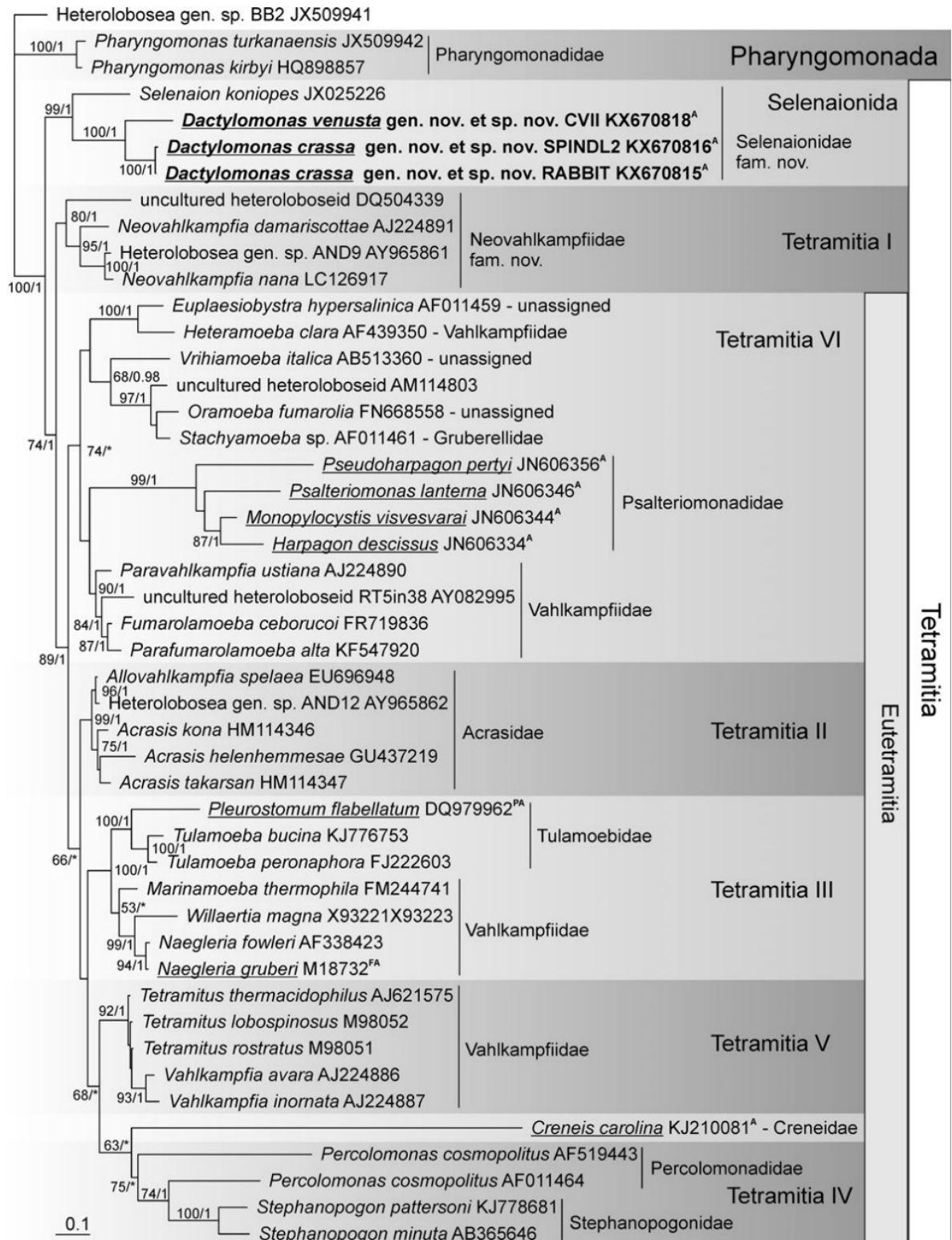
Na rozdíl od měňavek jsou bičíkovci heteroloboseí morfologicky rozmanití. Často mívají dva (např. u druhů rodů *Heteramoeba*, *Pleurostomum* nebo *Naegleria*) nebo čtyři bičíky (např. druhy rodů *Pharyngomonas*, *Percolomonas*, *Harpagon* nebo *Tetramitus*), řadí se sem ale i zástupci, kteří mají velmi neobvyklý počet bičíků – druh *Creneis carolina*, jehož hlavní forma má jeden bičík, ale v rámci svého životního cyklu může tvořit i formy se 14 bičíky (Pánek et al., 2014b), druhy rodu *Stephanopogon*, které díky svým mnoha bičíkům připomínají spíše nálevníka (např. Lee et al., 2014), nebo druh *Psalteriomonas lanterna*, který má 16 bičíků (Broers et al., 1990). Bičíky mohou být různě dlouhé, a kromě pohybu mohou sloužit i k přihánění bakteriální potravy do cytostomu ve ventrální rýze. Pro bičíkatý aparát většiny heteroloboseí je typický mohutný mikrotubulární kořen R2, který je asociovaný s bazálním tělískem B1 a rhizoplast, žíhaná fibrila, která ze strany přiléhá k bazálním tělískům (Brugerolle & Simpson, 2004; obr. 3, R2, Rh).

Někteří zástupci kmene Heterolobosea jsou schopni tvořit cysty. Stěna cysty je tvořená dvěma vrstvami, ektocystou a endocystou, a její morfologie je mezirodově variabilní. Cysty jednotlivých zástupců se liší vzdáleností jednotlivých vrstev, povrchem a přítomností a počtem pórů. Například druh *Pharyngomonas turkanaensis* má cystu s velmi zvrásněným povrchem ektocysty, která je navíc relativně vzdálená od endocysty a nemá žádný pór, zatímco cysty druhu *Monopylocystis visvesvarai* mají hladký povrch, obě vrstvy jsou těsně u sebe a mají jeden pór (Pánek, et al., 2014; Park & Simpson, 2016). Stádium cysty v rámci životního cyklu může chybět, tak je tomu například v rámci rodu *Harpagon* (Pánek et al., 2012).

Většina zástupců kmene Heterolobosea má jádro s centrálním jádérkem (Pánek & Čepička, 2012), časté je ale i jádérko parietální, které se vyskytuje například u zástupců

čeledí Selenionidae a Psalteriomonadidae (např. O’Kelly et al., 2003; Pánek et al., 2012; Hanousková et al., 2019). Buňky heteroloboseí postrádají klasický Golgiho aparát (Pánek & Čepička, 2012). Pro jejich mitochondrie jsou typické diskovité kristy. Někdy mohou být mitochondrie transformované na hydrogenozomy bez krist. To je typické pro anaerobní zástupce kmene Heterolobosea jako je čeleď Psalteriomonadidae, druh *Creneis carolina* a rod *Dactylomonas* (de Graaf et al., 2009; Pánek et al., 2012, 2014b; Hanousková et al., 2019).

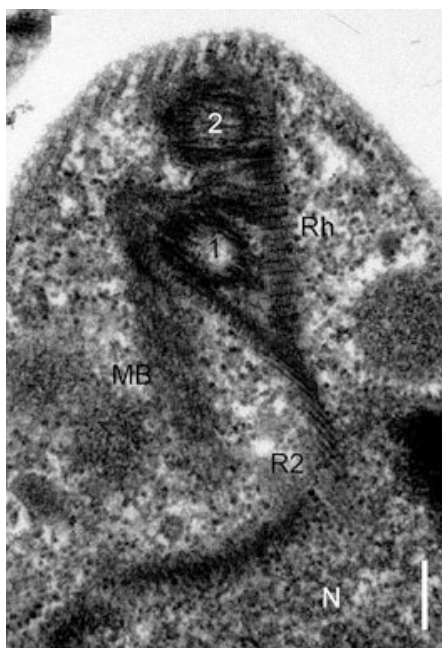
Kmen Heterolobosea se v současnosti dělí na dva podkmene – Pharyngomonada a Tetramitia (obr. 2; Cavalier-Smith & Nikolaev, 2008). Podkmen Pharyngomonada zahrnuje pouze jednu čeleď, Pharyngomonadidae, do níž se řadí tři druhy rodu *Pharyngomonas*. Bazální tělíska zástupců podkmene Pharyngomonada svírají ve dvojici pravý úhel a v bičíkovém aparátu jsou přítomny mikrotubulární kořeny R1 a C fibrila (Harding et al., 2013). Všichni zástupci podkmene Tetramitia jsou charakterizováni přítomností specifického helixu 17_1 v sekundární struktuře molekuly SSU rRNA (Nikolaev et al., 2004; Cavalier-Smith & Nikolaev, 2008). Bičíkovci se vyznačují většinou paralelním uspořádáním bazálních tělísek v mastigontu a absencí levého mikrotubulárního kořenu R1 a C fibrily (Hanousková et al., 2019). Tetramitia se rozděluje na skupiny Selenionida, Neovahlkampfiidae a Eutetramitia (Hanousková et al., 2019). Selenionida obsahuje jednu čeleď – Selenionidae – která není úplně typickou skupinou podkmene Tetramitia, protože bazální tělíska bičíkatých buněk jsou vůči sobě uspořádána do pravého úhlu. Neovahlkampfiidae je malá čeleď tvořící hlubokou fylogenetickou linii mezi skupinami Selenionida a Eutetramitia a zástupci této čeledi jsou známi pouze ve formě měňavky. Pro skupinu Eutetramitia je typické právě paralelní uspořádání bazálních tělísek a řadí se sem šest evolučních linií (Tetramitia II-VI, Creneidae) v nichž je obsažena většina diverzity heteroloboseí. V těchto šesti skupinách je rozlišeno osm čeledí (Orodruinidae – dříve Grubereidae; Psalteriomonadidae, Vahlkampfiidae, Acrasidae, Tulamoebidae, Creneidae, Percolomonadidae a Stephanopogonidae; obr. 2). Celkově je známo přibližně 140 druhů kmene Heterolobosea.



Obr. 2: Nezakořeněný fylogenetický strom kmene Heterolobosea vytvořený na základě genu pro 18S rRNA metodou maximum likelihood v programu RAXML s modelem GTR+GAMMA+I; podtržená jsou jména obligátně nebo fakultativně anaerobních zástupců; číselné hodnoty představují statistickou podporu v bootstrapových hodnotách/posteriorní pravděpodobnosti; hvězdičkou (*) jsou označeny hodnoty, které dosahují podpory menší než 50%/0.90. Podle Hanousková et al. (2019).

2.2 Charakteristika čeledi Psalteriomonadidae

Psalteriomonadidae (psalteriomonády) je čeleď kmene Heterolobosea patřící do evoluční linie Tetramitia VI (Pánek et al., 2012). Přestože jsou některé druhy této čeledi známé poměrně dlouhou dobu (první zástupce byl objeven v roce 1852), většina druhové diverzity byla popsána až v posledních deseti letech, čeleď v současné době zahrnuje 16 druhů v pěti rodech (Broers et al., 1990, 1993; O’Kelly et al., 2003; Pánek et al., 2012, 2014a). Všechny psalteriomonády jsou volně žijící a anaerobní nebo mikroaerofilní protisti (O’Kelly et al., 2003). Buňky bičíkovců psalteriomonád sdílejí specifickou ultrastrukturou bičíkového aparátu – mají stejné uspořádání bičíků, bazálních tělísek a rhizoplastu. Typický je i vzhled svazku mikrotubulárních kořenů spojující bazální tělísko a pravý a levý mikrotubulární kořen, připomínající harfu (obr. 3, R2). U ostatních heteroloboseí je výrazně kratší (Brugerolle & Simpson, 2004; Pánek et al. 2012).



Obr. 3: Organizace bičíkového aparátu u zástupce čeledi Psalteriomonadidae druhu *Pseudoharpagon pertyi*, 1, 2 – bazální tělíska bičíků, Rh – rhizoplast, R2 – kořen mikrotubulů, N – jádro, MB – svazek mikrotubulů, měřítko 200 nm (Pánek et al., 2016).

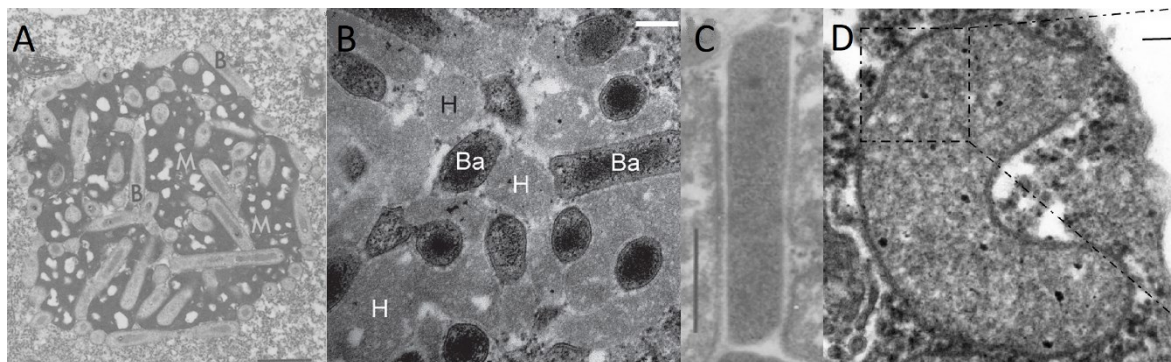
Dále jsou pro psalteriomonády typické mitochondrie, u kterých, v návaznosti na anaerobní způsob života, došlo k úplné redukci krist a genomu a jejich transformaci na hydrogenozomy (Pánek et al., 2012). Tvar hydrogenozomů psalteriomonád může být zakulacený – například u druhu *Monopylocystis visvesvarai*, nepravidelný – v rámci rodu *Psalteriomonas*, nebo miskovitý – v buňkách druhu *Sawyeria marylandensis* (obr. 3D; Pánek et al., 2014a; Barberà et al., 2010). Hydrogenozomy, oproti klasickým mitochondriím, v rámci svého energetického metabolismu produkují ATP pomocí substrátové fosforylace, vodík, oxid uhličitý a někdy i kyselinu octovou (Barberà et al.,

2010; Müller, 1993; De Graaf et al., 2009). Metabolická funkce hydrogenozomů psalteriomonád byla podrobně studována u druhu *S. marylandensis* a méně podrobně u druhu *Psalteriomonas lanterna* (Broers et al., 1990; Barberà et al., 2010).

U zástupců druhu *Psalteriomonas lanterna* se vyskytují dva typy morfologicky odlišných hydrogenozomů, ti mají kromě „typických“, výše zmiňovaných hydrogenozomů, ještě „modifikované mitochondrie“, které jsou tvarově podobné hydrogenozomům v rámci globule, ale tyto se vyskytují samostatně v cytoplazmě a jsou obklopené jednou až dvěma cisternami hrubého endoplazmatického retikula. I přesto, že tyto dva typy derivátů mitochondrií mají odlišný vzhled, v buňce mají pravděpodobně stejnou funkci (De Graaf et al., 2009).

V blízkosti hydrogenozomů buněk rodu *Psalteriomonas* se mohou nacházet methanogenní symbionti, kteří pravděpodobně využívají produkovaný vodík. Buňky druhu *P. lanterna* obsahují kompaktní agregát přibližně 20 hydrogenozomů, který je prostoupen mnoha buňkami symbiontů (obr. 4A), podobně je tomu i u druhu *P. vulgaris* (obr. 4C) a *P. magna* (obr. 4B; Broers et al., 1990, 1993; Pánek et al., 2012).

Buňky psalteriomonád mají nejčastěji jedno jádro a oproti většině ostatních heteroloboseí, které mívají jedno centrální jádérko, mají často parietální jádérko. Tak je tomu v rámci rodů *Sawyeria*, *Harpagon* nebo *Psalteriomonas* (O’Kelly et al., 2003, Pánek et al., 2012). Dále může být jádérko rozprostřené pod celou jadernou membránou, jako například u zástupců rodu *Monopylocystis* (např. O’Kelly et al., 2003, Pánek et al., 2014a).



Obr. 4: A: hydrogenozomy (M) druhu *Psalteriomonas lanterna* s přidruženými buňkami symbiontů (B; měřítko 1 μ m; Broers et al., 1990); B: hydrogenozomy (H) druhu *P. magna* s přidruženými buňkami prokaryot (měřítko 250 nm; Pánek et al., 2012); C: methanogenní symbiont mezi hydrogenozomy v buňce druhu *P. vulgaris* (měřítko 500 nm; Broers et al., 1993); D: neobvyklý miskovitý hydrogenozom druhu *Sawyeria marylandensis* (měřítko 100 nm; Barberà et al. 2010).

Celá čeleď Psalteriomonadidae je anaerobní a její zástupci se vyskytují kosmopolitně ve vodním anoxickém (případně mikrooxickém) prostředí, jako jsou různé sladkovodní, mořské nebo brakické sedimenty (Pánek et al., 2012, 2014a), kde se psalteriomonády živí bakteriemi.

2.3 Diverzita čeledi Psalteriomonadidae

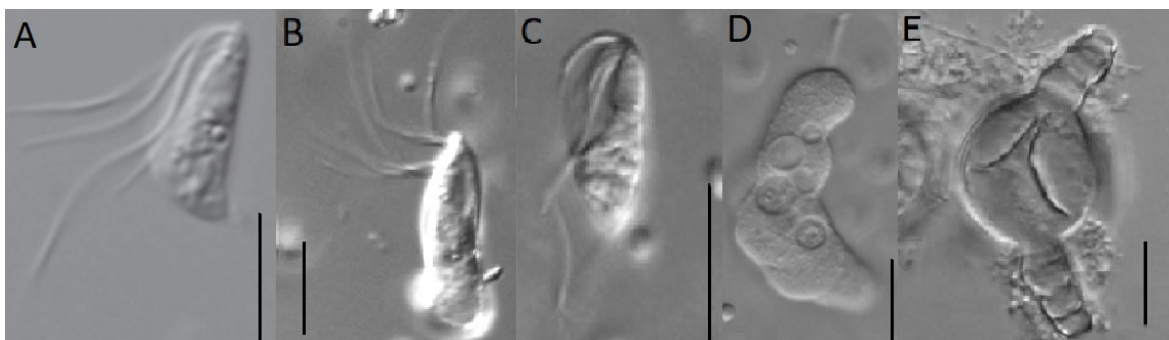
V současné době je v čeledi Psalteriomonadidae popsáno pět rodů – *Pseudoharpagon*, *Sawyeria*, *Psalteriomonas*, *Monopylocystis* a *Harpagon*, celkem se 16 druhy. V diplomové práci Kristýny Uhrové (2017) ale bylo objeveno (ne však formálně popsáno) 16 nových linií, které pravděpodobně představují nové druhy, v některých případech i rody (Uhrová, 2017).

Fylogenetické analýzy čeledi Psalteriomonadidae jsou založeny na sekvencích genu pro molekulu RNA malé ribozomální podjednotky (18S SSU rRNA, Pánek et al., 2012, 2014a; Uhrová, 2017). V rámci třídy Heterolobosea je tato čeleď blízce příbuzná kládu, který je tvořen rody *Vrihiamoeba*, *Oramoeba* a *Stachyamoeba* (Pánek et al., 2014a). V samotné čeledi Psalteriomonadidae jsou rody rozdělené do tří linií. První je tvořen rodem *Pseudoharpagon*, druhý rody *Sawyeria* a *Psalteriomonas*, a třetí rody *Monopylocystis* a *Harpagon* (Pánek et al., 2012).

2.3.1 Rod *Pseudoharpagon* Pánek, Silberman, Yubuki, Leander & Čepička, 2012

Rod *Pseudoharpagon* zahrnuje tři druhy – *P. tertius* Pánek, Ptáčková & Čepička, 2014; *P. pertyi* Pánek, Silberman, Yubuki, Leander & Čepička, 2012 a *P. longus* Pánek, Ptáčková & Čepička, 2014. Zástupci tohoto rodu se vyskytují v mořských nebo brakických vodách, jejich buňky jsou jednojaderné a v rámci životního cyklu jsou schopni tvořit formu bičíkovce, forma měňavky byla pozorována u dvou druhů (Pánek et al., 2014a). Velikost bičíkovců druhů *P. pertyi* a *P. tertius* se pohybuje kolem 15 μm , jejich buňky mají ventrální rýhu, která zasahuje do dvou třetin délky buňky. Buňky obou druhů se pohybují pomocí čtyř bičíků (obr. 5A, C; Pánek et al., 2012, 2014a). Buňky bičíkovce druhu *P. longus* jsou větší, jejich délka se pohybuje okolo 20 μm a obvykle mají pět bičíků (obr. 5B). U tohoto druhu byla pozorována schopnost tvořit cysty, které jsou kulaté a mají

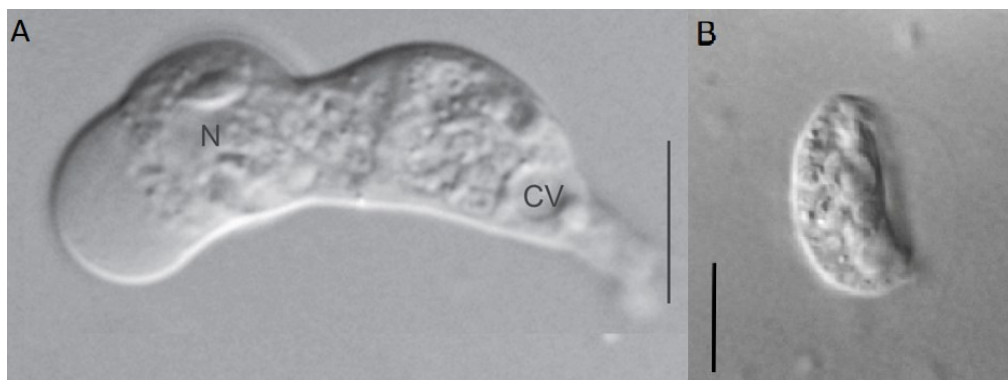
nejčastěji dva segmentované výběžky (obr. 5E; Pánek et al., 2014a). Velikost měňavky druhů *P. longus* a *P. tertius* se v průměru pohybuje kolem 38,5 μm (obr. 5D). U druhu *P. pertyi* měňavky nebyly pozorovány (Pánek et al., 2012).



Obr. 5: Zástupci rodu *Pseudoharpagon*: A: bičíkovec druhu *P. pertyi* (Pánek et al., 2012); B: bičíkovec druhu *P. longus*; C: bičíkovec druhu *P. tertius*; D, E: měňavka a cysta druhu *P. longus* (Pánek et al., 2014a); měřítko 10 μm .

2.3.2 Rod *Sawyeria* O'Kelly, Silberman, Amaral-Zettler, Nerad & Sogin, 2003

Do rodu *Sawyeria* se řadí pouze jediný druh – *S. marylandensis* O'Kelly, Silberman, Amaral-Zettler, Nerad & Sogin, 2003. Tento druh se nejčastěji vyskytuje ve formě jednojaderné měňavky, jejíž velikost se pohybuje kolem 30 μm (obr. 6A). *Sawyeria* se vyskytuje ve sladkovodním prostředí (O'Kelly et al., 2003). V buňkách tohoto druhu se nacházejí hydrogenozomy, které vytvářejí miskovitý tvar (Barberà et al., 2010). Kromě měňavkové formy Uhrová (2017) popsala izolát RYBNIK1, který představuje formu čtyřbičíkatého bičíkovce druhu *S. marylandensis* (obr. 6B). Bičíkovec je dlouhý přibližně 17 μm , má ventrální rýhu, která probíhá podél celé buňky a jádro se dvěma jádérky.

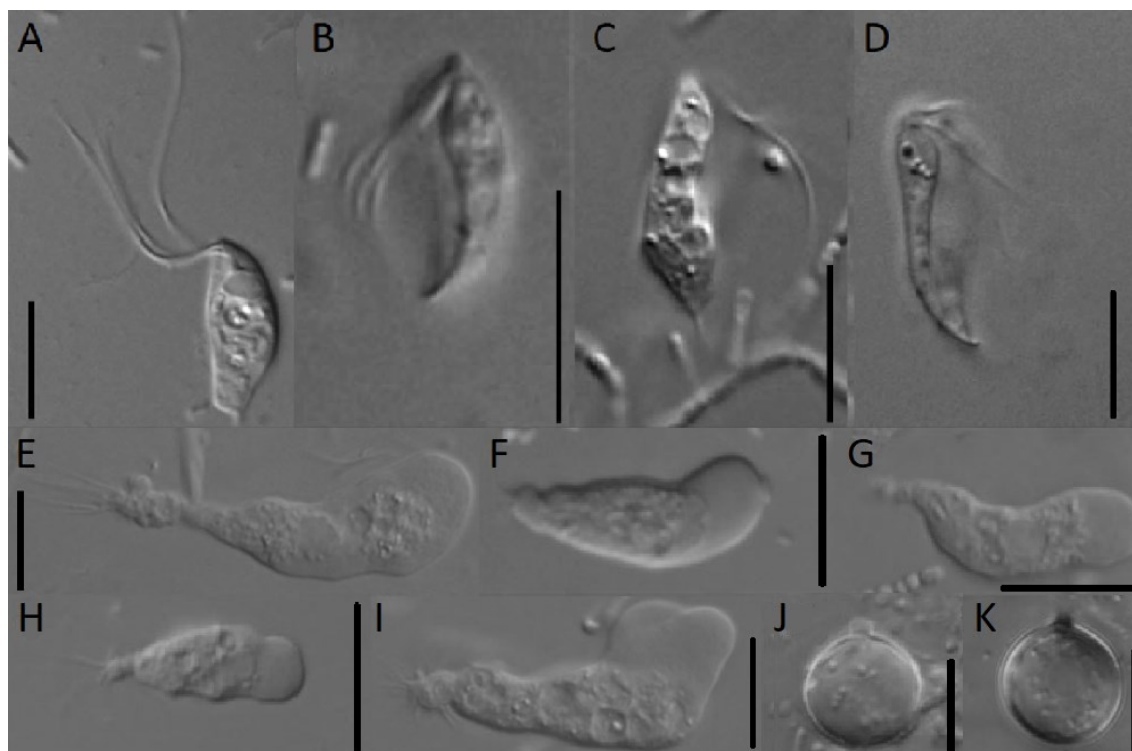


Obr. 6: A: měňavka druhu *Sawyeria marylandensis* (N – jádro, CV – kontraktální vakuola; Pánek et al., 2012), B: bičíkovec druhu *S. marylandensis* – izolát RYBNIK1 (Uhrová, 2017); měřítko 10 μm .

2.3.3 Rod *Monopylocystis* O'Kelly, Silberman, Amaral-Zettler, Nerad & Sogin, 2003

Rod *Monopylocystis* zahrnuje šest druhů – *M. visvesvarai* O'Kelly, Silberman, Amaral-Zettler, Nerad & Sogin, 2003; *M. disparita* Pánek, Ptáčková and Čepička, 2014; *M. robusta* Pánek, Ptáčková and Čepička, 2014; *M. elegans* Pánek, Ptáčková & Čepička, 2014; *M. minor* Pánek, Ptáčková & Čepička, 2014 a *M. anaerobica* Smirnov & Fenchel, 1996 (Pánek, Silberman, Yubuki, Leander & Čepička, 2012) a je tak nejpočetnějším rodem čeledi Psalteriomonadidae. Zástupci tohoto rodu se vyskytují v mořských nebo brakických vodách a mohou vytvářet měňavky, bičíkovce i cysty (ale ne všechny formy byly u všech druhů nalezené). Měňavky rodu *Monopylocystis* mají jedno jádro, které je při lokomoci deformované (Pánek et al., 2014a). Od ostatních měňavek stejné čeledi jsou odlišitelné strukturou jádérka, které je umístěné v tenké vrstvě pod jadernou membránou, zatímco u ostatních rodů je jádérko nejčastěji parietální (Smirnov & Fenchel, 1996; Pánek et al., 2014a). Od měňavek rodu *Pseudoharpagon* se měňavky rodu *Monopylocystis* odlišují jasnější hranicí mezi granuloplazmou a hyaloplazmou (Pánek et al. 2014). Bičíkovci mají ventrální rýhu, která se táhne po téměř celé délce buňky. Cysty mají jeden velmi výrazný pór s vyčnívající zátkou, díky němuž si tento rod vysloužil svůj název, a mezidruhově se liší pouze nepatrně velikostí (7–12 μm ; např. obr 7J, K). Druh *M. visvesvarai* tvoří průměrně 20 μm dlouhé měňavky (obr. 7E; O'Kelly et al., 2003; Pánek et al., 2014a). Čtyř bičíkatí bičíkovci byly pozorováni pouze u jednoho z několika kmenů a velikostně se pohybují kolem 16 μm (obr. 7A; Pánek et al. 2012). Měňavky druhu *M. anaerobica* (původně popsány jako *Vahlkampfia anaerobica* – Smirnov & Fenchel, 1996) jsou velké 23 μm a jsou schopné vytvářet plovoucí formu, která má paprscitý tvar. Bičíkovci při popisu nebyli pozorováni (Smirnov & Fenchel, 1996). *M. anaerobica* je morfologicky velmi podobná druhu *M. visvesvarai*, tyto dva druhy se odlišují pouze schopností prvního tvořit plovoucí formu s paprsky, je proto možné, že by se mohlo jednat o tentýž druh (Pánek et al., 2014a). Druh *M. minor* tvoří o něco menší měňavky o velikosti 17 μm a výrazně menší bičíkovce s 11 μm (Pánek et al. 2014). Měňavky druhu *M. elegans* jsou dlouhé přibližně 23 μm a od ostatních měňavek stejného rodu se liší umístěním jádra hlouběji v granuloplazmě a jeho nižší deformací při lokomoci (obr. 7G). Bičíkovci mají variabilnější délku, průměrně se pohybující okolo 18 μm (obr. 7C). U druhu *M. robusta*

nebyla pozorovaná bičíkatá stádia. Měňavky mají větší velikost, než ostatní druhy – okolo 32 μm (obr. 7I). Druh *M. disparata* má formu měňavky menší velikosti – kolem 16 μm (obr. 7H), bičíkovec je naopak dlouhý (přibližně 24 μm ; obr. 7D; Pánek et al., 2014a).

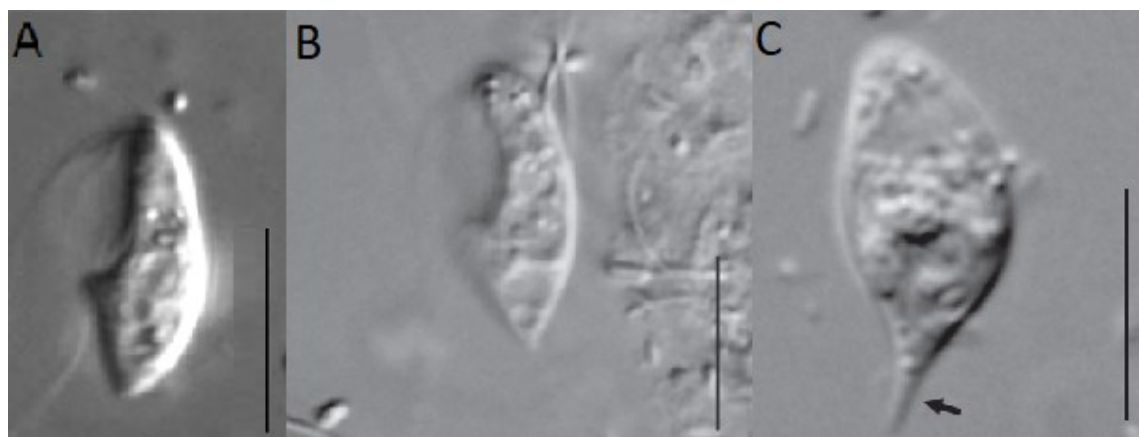


Obr. 7: Zástupci rodu *Monopylocystis*: A, E: bičíkovec a měňavka druhu *M. visvesvarai*; B, F: bičíkovec a měňavka druhu *M. minor*; C, G: bičíkovec a měňavka druhu *M. elegans*; D, H: bičíkovec a měňavka druhu *M. disparata*; I: měňavka druhu *M. robusta*; J: cysta druhu *M. visvesvarai*; K: cysta druhu *M. robusta* (Pánek et al., 2014a), měřítka 10 μm .

2.3.4 Rod *Harpagon* Pánek, Silberman, Yubuki, Leander & Čepička, 2012

Do rodu *Harpagon* se řadí tři druhy – *H. salinus* Pánek, Ptáčková & Čepička, 2014; *H. schusteri* Pánek, Silberman, Yubuki, Leander & Čepička, 2012 a *H. descissus* Perty, 1852. Zástupci tohoto rodu jsou sladkovodní nebo se vyskytují ve slaništích a tvoří pouze formu bičíkovce; měňavky ani cysty dosud nebyly pozorovány. Morfologicky se bičíkovci rodu *Harpagon* podobají bičíkovcům rodu *Pseudoharpagon*, ale mají kratší ventrální rýhu, jež zasahuje do poloviny délky buňky nebo ji mírně přesahuje, zatímco zástupci rodu *Pseudoharpagon* mají ventrální rýhu delší. Liší se také svým většinovým výskytem (sladkovodní vs. mořské prostředí; Pánek et al. 2014). Velikost bičíkovců druhu *H. descissus* se pohybuje kolem 17 μm a jejich buňky mají čtyři nestejně dlouhé bičíky (obr. 8C). Velikostně i vzhledem je tento druh téměř totožný s druhem *H. schusteri*, liší se pouze schopností tvořit bičíkovce s vřetenovitě protaženou zadní částí buňky (srov. obr. 8B

a 8C; Pánek et al., 2012). Druh *H. salinus* se vyskytuje ve vodách vnitrozemských slanisek. Vytváří bičíkovce, kteří jsou s průměrnou délkou 13 μm o něco menší než ostatní zástupci rodu (obr. 8A; Pánek et al., 2014a).

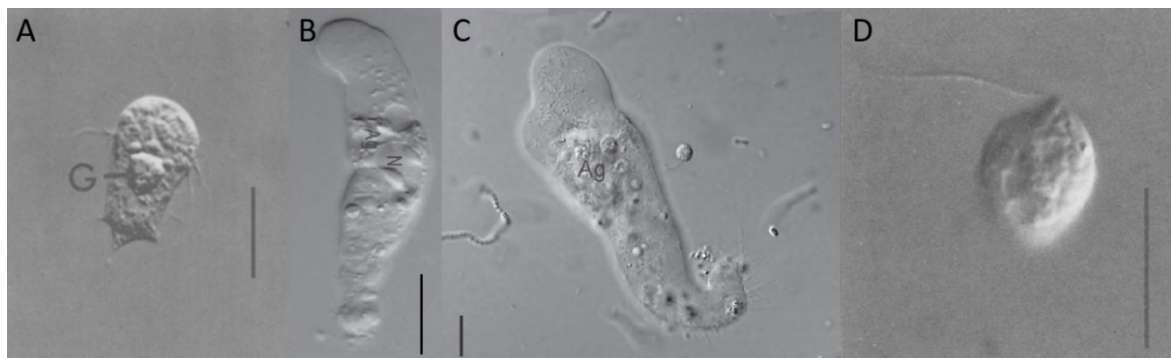


Obr. 8: Zástupci rodu *Harpagon*: A: *H. salinus* (Pánek et al., 2014a), B: *H. schusteri*, C: *H. descissus* (šipka – vřetenovitě protažená zadní část buňky; Pánek et al., 2012); měřítko 10 μm .

2.3.5 Rod *Psalteriomonas* Broers, Stumm, Vogels & Brugerolle, 1990

Do rodu *Psalteriomonas* se řadí tři druhy – *P. lanterna* Broers, Stumm, Vogels & Brugerolle, 1990; *P. vulgaris* Broers, Meijers, Symens, Stumm & Vogels, 1993 a *P. magna* Pánek, Silberman, Yubuki, Leander & Čepička, 2012. Zástupci tohoto rodu jsou sladkovodní a mohou se vyskytovat jako améboflageláti, ale také pouze ve formě bičíkovce nebo měňavky; cysty zatím pozorovány nebyly. Druh *P. lanterna* je améboflagelát. Bičíkovci tohoto druhu jsou morfologicky velmi odlišní od ostatních psalteriomonád, protože mají zmnožené některé komponenty buňky (Broers et al., 1990). Jsou přibližně 25 μm dlouzí a mají čtyři ventrální rýhy, které zasahují do dvou třetin délky buňky a u každé rýhy buňky vycházejí čtyři stejně dlouhé bičíky, dohromady jich tedy mají 16. Dále mají bičíkovci čtyři jádra s centrálním jadérkem (obr. 9A Broers et al., 1990). Pod jádry, uprostřed buňky, je umístěná výrazná globulární struktura, která je velká 7 μm a je složená z 20 hydrogenozomů obklopenými dvěma stovkami methanogenních endosymbiontů (viz výše obr. 4A; Broers et al., 1990, 1992; De Graaf et al., 2009). Měňavky druhu *P. lanterna* jsou velké průměrně 45 μm a agregát hydrogenozomů je lokalizovaný kolem jediného jádra, zde ale netvoří globuli (obr. 9B). Druh *P. vulgaris* se vyskytuje pouze ve formě bičíkovce. Má čtyři stejně dlouhé bičíky, jedno jádro a ventrální rýhu, která zasahuje do dvou třetin délky buňky. Buňka je dlouhá přibližně 12 μm (obr. 9D; Pánek et al., 2012). Uvnitř buněk tohoto druhu se také nacházejí methanogenní

endosymbionti, jejichž množství kolísá mezi 12–50 (viz výše obr. 4C; Broers et al., 1993). Naopak u druhu *P. magna* nebylo stádium bičíkovce dosud pozorováno a je známá pouze ve formě měňavky. Morfologicky se měňavka tohoto druhu podobá měňavce druhu *P. lanterna*, je ale výrazně větší, průměrně je dlouhá 70 μm (obr. 9C). V blízkosti jádra je také agregát hydrogenozomů, který je prostoupený buňkami prokaryot (viz výše obr. 4B). Kromě tohoto agregátu se další hydrogenozomy vyskytují i jednotlivě v rámci cytoplazmy (Pánek et al., 2012).



Obr. 9: Zástupci rodu *Psalteriomonas*: A: *P. lanterna* – bičíkovec (G – globule hydrogenozomů a symbiontů; Broers et al., 1990), B: *P. lanterna* – améba (Ag – agregát hydrogenozomů a symbiontů, N – jádro) C: *P. magna* (Ag – agregát hydrogenozomů a symbiontů; Pánek et al., 2012); D: *P. vulgaris* (Broers et al., 1993), měřítko 10 μm .

2.3.6 Nepopsané druhy psalteriomonád

Kromě popsáných druhů a rodů čeledi *Psalteriomonadidae* bylo v rámci diplomové práci K. Uhrové (2017) objeveno 16 nových linií, které velmi pravděpodobně představují nové druhy. Navržené byly tři nové druhy spadající do rodu *Sawyeria*, z nichž všichni tvoří pouze měňavky a morfologicky jsou podobné popsanému druhu *S. marylandensis*. Zajímavý je izolát KAKADU, který má ve svých měňavkovitých buňkách v blízkosti jádra přítomný nápadný agregát hydrogenozomů a symbiontů, který se podobá agregátu druhů *Psalteriomonas lanterna* a *P. magna*. Dále byly objeveny linie, které jsou umístěné v blízkosti již popsáných druhů rodu *Harpagon* (např. izolát KRP2 nebo LAGUNDRI) a pravděpodobně představují nové druhy. Kromě těchto linií byly v rámci linie *Psalteriomonas/Sawyeria* osekvenovány izoláty (VLADA7SW, CID1KULTUR, H1N), které představují hluboké větve sesterské větvi vedoucí k rodům *Sawyeria* a *Psalteriomonas*, ty ale nebyly ve stabilní kultuře a jejich morfologie nebyla studována. Pravděpodobně ale představují nové rody čeledi *Psalteriomonadidae*.

2.4 Endosymbióza anaerobních protist a methanogenních archeí

Symbiózy protist s prokaryotickými organismy jsou relativně časté a dochází k nim i v anoxickém prostředí. Významnými symbionty v tomto prostředí jsou zejména zástupci methanogenních archaea, kteří se vyskytují i u některých psalteriomonád. Kapitoly níže shrnují důležité informace související s endosymbiózou methanogenů a protist.

2.4.1 Methanogeneze

Methanogeneze je posledním krokem v anaerobním rozkladu komplexních organických sloučenin, při kterém se vodík, oxid uhličitý, methanol, methylaminy nebo kyselina octová mění na methan. Protože je to anaerobní proces, probíhá v anoxickém prostředí, ať už ve volné přírodě (v bažinách, sladkovodních i mořských sedimentech, mokřadech apod.), tak uvnitř zažívacího traktu některých živočichů (Blaut, 1994). Tímto procesem mohou některé organismy v rámci svého metabolismu získávat energii ve formě ATP. Organismy schopné methanogeneze jsou označovány jako methanogeni (methanogenní archaea; Buan, 2018). Přestože se všechny dosud známé organismy schopní methanogeneze řadí do domény Archaea (Fox et al., 1977; Woese et al., 1978), existují i další organismy, zejména bakterie, které mohou produkovat malé množství methanu. Ten je ale tvořen jako meziprodukt a nepřispívá k energetickému metabolismu a organismy, které ho tímto způsobem produkují, nejsou považovány za methanogeny (Karl et al., 2008). Kromě toho se na produkci methanu podílejí například i rostliny, ale v porovnání s methanogeny pouze v zanedbatelné míře. Vyprodukovaný methan může být zpracován methanotrofy nebo jeho část může být následně uvolněna do atmosféry, kde působí jako velmi silný skleníkový plyn (Kirschke et al., 2013). Methanu je v porovnání s oxidem uhličitým v atmosféře méně, ale jako skleníkový plyn působí až třicetkrát silněji a podílí se tak znatelně na globálním oteplování (Barber, 2016).

2.4.2 Methanogenní archaea

Podle substrátu, který je využíván pro tvorbu methanu se methanogenní archaea rozlišují na methanogeny methylootropní, acetoklastické a hydrogenotropní. Methylootropní methanogeneze jsou schopná archaea zejména z řádu Methanosarcinales a využívají methylované sloučeniny, jako jsou methanol a methylaminy, jako donory a akceptory

elektronů (Liu & Whitman, 2008; Rother & Metcalf, 2004). Acetoklastická metanogeneze využívá jako substrát pro tvorbu methanu acetát a probíhá například u methanogenů rodu *Methanosarcina* a *Methanosaeta* (Liu & Whitman, 2008). U zdaleka nejvíce methanogenů ale probíhá hydrogenotropní metanogeneze, při které se redukuje oxid uhličitý na metan pomocí vodíku jako donoru elektronů (Liu & Whitman, 2008). V současnosti je známo sedm archeálních řádů, ve kterých se vyskytují methanogeni, a to Methanopyrales, Methanococcales, Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanocellales, Methanomassiliicoccales a Methanosarcinales, patřící do tří různých kmenů (Buan, 2018).

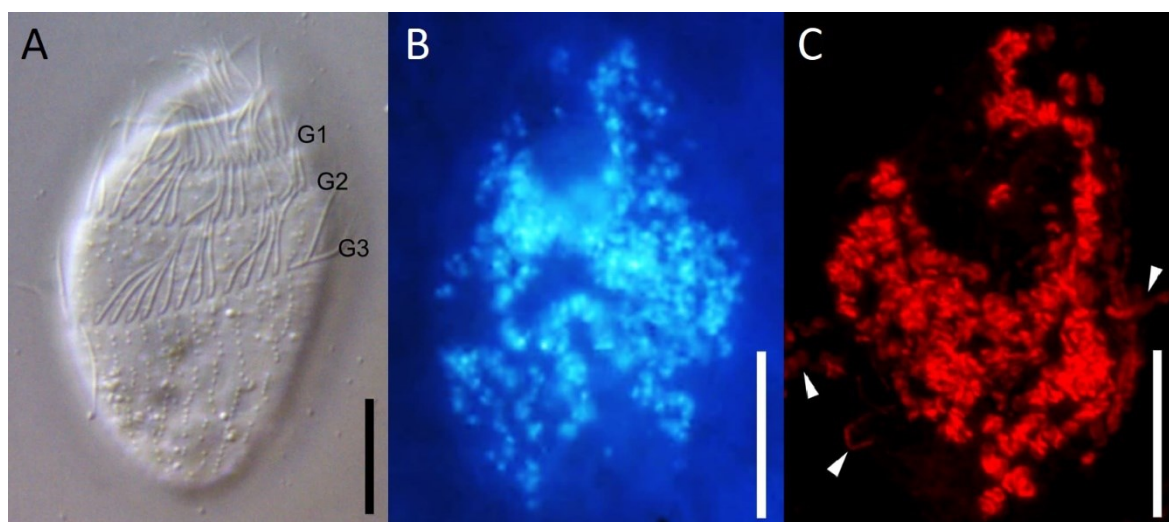
Methanogenní archaea se vyskytují ve volné přírodě, v zaživacím traktu některých živočichů a také uvnitř buněk některých protist. Tyto syntrofické endosymbiosy (tj. symbiózy založené na výměně produktů energetického metabolismu, McInerney et al., 2009) protist s methanogeny jsou založené na mutualistické asociaci hydrogenozomů hostitelů nejčastěji s hydrogenotropními methanogeny. Hydrogenozomy produkují energii fermentací pyruvátu na vodík a kyselinu octovou a methanogeni vznikající vodík využívají pro redukci oxidu uhličitého v rámci svého energetického metabolismu (Müller, 1993). Tento typ endosymbiózy se vyskytuje u některých anaerobních protist, a zdaleka nejvíce jsou endosymbionti studováni u nálevníků z třídy Armophorea (např. Van Hoek et al., 2000). Kromě nálevníků byly methanogeni identifikováni také například u archaméb druhů *Pelomyxa palustris* (van Bruggen et al., 1983, 1988; Gutiérrez et al., 2017) a *Mastigella vitrea* (van Bruggen et al., 1985) a u některých zástupců čeledi Psalteriomonadidae (Broers et al., 1990, 1993).

2.4.3 Možnosti identifikace methanogenních endosymbiontů protist

Methanogenní symbionti jsou v buňce hostitele snadno zaznamatelní díky své schopnosti autofluoreskovat při ozáření UV světlem (obr. 10B; Doddema & Vogels, 1978). Na autofluorescenci se podílí zejména dva koenzymy – F420 a koenzym M. Koenzym F420 slouží jako donor elektronů při redukci oxidu uhličitého na metan (Hendrickson & Leigh, 2008). Koenzym M se podílí na tvorbě methanu z methylkobalaminu transmethylací (Wolfe & McBride, 1971). Při ozáření buněk UV světlem o vlnové délce 420 nm dojde k oxidaci těchto látek a ty pak emitují modro zelené světlo (Doddema & Vogels, 1978; Mink & Dugan, 1977). Autofluorescence ale u methanogenů nemusí být vždy přítomná, a naopak může být výjimečně pozorována u bakterií, například v případě archaméby *Pelomyxa palustris*, která obsahuje jako symbionty zástupce rodu

Methanosaeta a bakterií rodu *Rhodococcus*, proto jsou pro ověření identity potřebné další metody (Gutiérrez et al., 2017).

Původně se methanogenní symbionti anaerobních protist determinovali hlavně na základě morfologické podobnosti s již identifikovanými symbionty (např. van Bruggen et al., 1985). Kromě morfologie se symbionti porovnávali na základě fyziologických vlastností a rychlosti růstu za určitých kultivačních podmínek. S přibývajícím způsoby a metodami identifikace zástupců domény Archaea se diverzita symbioticky žijících methanogenů začala zvyšovat (Gutiérrez et al., 2017). Dnes se nejčastěji využívá metod fluorescenční in-situ hybridizace (FISH, obr. 10C) a sekvenace části genu pro 16S rRNA. Tímto způsobem se také přišlo na to, že někteří zástupci stejného druhu protist mohou mít celkem nepříbuzné druhy symbiotických methanogenů, a naopak nepříbuzné druhy hostitelů zase mohou mít příbuzné symbionty (Embley & Finlay, 1993; např. Lewis et al., 2018, Embley et al., 1992a).



Obr. 10: A: Vizualizace buňky nálevníka druhu *Trimyema finlayi* pomocí světelné mikroskopie s diferenciálním interferenčním kontrastem; B: autofluorescence kofaktoru F420 endosymbiontů (modrá barva) nálevníka; C: vizualizace methanogenů (červená barva) pomocí fluorescenční in-situ hybridizace s proubou specifickou pro gen pro 16S rRNA domény Archaea; měřítko 10 μm (Lewis et al., 2018).

2.4.4 Diverzita endosymbiotických methanogenů

Endosymbiotickými methanogeny protist mohou být zástupci různých skupin methanogenních archeí. Příkladem je zástupce rodu *Methanosaeta* (Methanosarcinales), který se vyskytuje u archaméb druhu *Pelomyxa palustris* (Gutiérrez et al., 2017). Zástupce stejného rodu se vyskytuje jako symbiont i u nálevníka druhu *Metopus es* (Narayanan et al., 2009). U druhu *Metopus contortus* byl identifikován endosymbiont rodu

Methanoplanus (Methanomicrobiales) a pojmenován jako *M. endosymbiosus* (van Bruggen et al., 1986). Dalším symbiontem zástupce rodu *Metopus* je druh rodu *Methanoregula* (Methanomicrobiales), který je příbuzný druhu *M. boonei* (Hirakata et al., 2015). Dalším symbiontem může být druh rodu *Methanocorpusculum* (Methanomicrobiales) blízký druhu *M. parvum*. Tento druh žije u nálevníka *Metopus contortus* (Embley et al., 1992a) a také u relativně nepříbuzného nálevníka rodu *Trimyema finlayi* (obr. 6A; Lewis et al., 2018). U dalšího druhu rodu *Trimyema* – *T. compressum* – byl methanogen identifikován jako druh rodu *Methanobrevibacter* (Methanobacteriales), příbuzný volně žijícímu druhu *M. arboriphilus* (Lewis et al., 2018). Samotný druh *Methanobacterium formicicum* nebo jeho blízce příbuzný druh je identifikovaným symbiontem například druhů metopidních nálevníků *Urostomides striatus* (van Bruggen et al., 1984) a *Heterometopus palaeformis* (Embley et al., 1992b) nebo archaméby rodu *Mastigella* (van Bruggen et al., 1985). Jako symbiont byl druh *M. formicicum* popsán i u některých zástupců čeledi Psalteriomonadidae – *Psalteriomonas lanterna* (Broers et al., 1990) a *P. vulgaris* (Broers et al., 1993), ale pouze na základě jejich morfologické podobnosti s tehdy známými methanogenními symbionty (obr. 5A, C). Podobní methanogeni se vyskytují i u mnoha dalších protist (např. u skutikociliátů druhu *Cyclidium porcatum* a izolátu skutikociliáta GW7; Clarke et al., 1993; Takeshita et al., 2019).

Počet buněk methanogenů v buňkách hostitele je variabilní, může se pohybovat v desítkách, jako je tomu u druhu *Psalteriomonas vulgaris* (Broers et al., 1993), přes stovky, jako je tomu u druhu *P. lanterna* (Broers et al., 1992), k tisícovkám, jako například u druhu *Plagiopyla frontata* (Fenchel & Finlay, 2010), až k desetitisícům buněk u archaméby druhu rodu *Mastigella* s 22000 buňkami symbiontů (van Bruggen et al., 1985).

Také rozmístění buněk methanogenních endosymbiontů v hostitelských buňkách se může u různých druhů lišit, často ale koreluje s rozmístěním hydrogenozomů, aby symbionti mohli jednodušeji získávat jejich produkty. U bičíkoviců druhu *Psalteriomonas lanterna* se symbionti vyskytují ve středu buňky, kde jsou v blízkosti asi 20 hydrogenozomů, se kterými tvoří kompaktní globuli (obr. 5A; De Graaf et al., 2009). Kompaktní agregát methanogenů a hydrogenozomů je také například u skutikociliáta *Cyclidium porcatum* (Clarke et al., 1993). U jiných nálevníků bývají symbionti rozmístěni pod povrchem celé buňky u hydrogenozomů, které dodávají energii velkému množství brv (např. van Bruggen et al., 1986).

Při dlouhodobé kultivaci protist také může někdy docházet k nechtěné ztrátě methanogenních endosymbiontů. K této ztrátě došlo například u bičíkovců druhu *Psalteriomonas lanterna* po jejich více než dvacetileté kultivaci. Absence symbiontů nicméně morfologii ani umístění hydrogenozomů příliš nezměnila (De Graaf et al., 2009). Ztráta symbionta byla zaznamenána i v případě nálevníka druhu *Trimyema compressum*, zde tato absence methanogenů vedla ke změně produktů energetického metabolismu (Yamada et al., 1997).

3. Materiál a metodika

3.1 Sběr vzorků, kultivace

Přibližně dva mililitry sladkovodního sedimentu byly napipetovány do 15ml zkumavky s 10 ml Sonnebornova parameciového (ATTC medium 802) nebo 3% LB média. Vzorky byly poté udržovány a pasážovány jednou týdně, případně jednou za dva týdny přesunem jednoho mililitru sedimentu ve zkumavce do zkumavky s vhodným sterilním kultivačním médiem.

Kultury, které byly uloženy v kryobance a zamražené v tekutém dusíku, byly z mrazicí nádoby vyjmuty a napipetovány do zkumavky s vhodným médiem. Tyto vzorky pak byly pasážovány každé čtyři dny, dokud nedošlo k vymytí dimethylsulfoxidu, který sloužil jako kryoprotektant. Poté se pokračovalo v kultivaci s pasážováním jednou za týden nebo jednou za dva týdny.

3.1.1 Příprava kultivačních médií

Sonnebornovo parameciové médium (ATTC medium 802) bylo připraveno povařením 1,25 g prášku Cereal Grass Media v několika mililitrech destilované vody po dobu 5 minut. Po jeho vychladnutí byl tento roztok přefiltrován přes filtrační papír a jeho objem byl doplněn vodou do 500 ml a bylo přidáno 0,25 g hydrogenufosforečnanu sodného. Nakonec bylo připravené médium sterilizováno v autoklávu.

3% LB Broth médium bylo připraveno rozpuštěním 15 g prášku LB Broth v 500 ml destilované vody a následně sterilizováno v autoklávu.

3.2 Vybírání a vymývání jednotlivých buněk

Pro práci s jednotlivými buňkami psalteriomonád bylo přibližně 25 μ l sedimentu z kultivační zkumavky napipetováno na podložní sklíčko s jamkami. Pomocí mikropipety a při pozorování v invertovaném mikroskopu byly buňky ze sedimentu jednotlivě přenášeny do jamek se sterilním médiem, aby došlo k odstranění co nejvíce nečistot a ostatních, zejména prokaryotických, organismů. Přibližně 25 buněk očištěných tímto způsobem bylo poté přeneseno do 1,5ml mikrozkušavky, ve které bylo napipetováno

50 µl sterilního média a buňky se nechaly hladovět 1–2 hodiny, aby strávily co nejvíce obsahu potravních vakuol. Takto vyhladovělé buňky byly přeneseny do 1,5ml zkumavky s 30 µl DNA/RNA Shield (Zymo Research). Pokud nebylo nutné nechat buňky hladovět, vložily se ihned po omytí do 1,5ml zkumavky s 30 µl DNA/RNA Shield (Zymo Research).

3.3 Izolace DNA

DNA bylo izolováno a extrahováno z 250 µl sedimentu kultury nebo z jednotlivých buněk uchovaných v DNA/RNA Shield (Zymo Research) pomocí Genomic DNA Mini Kit (Geneaid), podle přiloženého protokolu. Alternativně bylo pro izolaci DNA z jednotlivých buněk využito MasterPure Complete DNA & RNA Purification Kit (Lucigen) a postupovalo se podle přiloženého protokolu.

3.4 Amplifikace genů pro 16S a 18S rRNA

Příprava pro amplifikaci izolované DNA probíhala smícháním DNA s PPP Master mix (Top-Bio), deionizovanou vodou (PCR H₂O, Top-Bio) a specifickými primery pro čeledi Psalteriomonadidae (HETERF1, HETER1K; tabulka č. 3) nebo primery pro Archaea (ARCH915F, ARCR1326; tabulka č. 3). Amplifikace proběhla v cykléru T100 Thermal Cycler (BIO RAD; tabulka č. 4, 5).

Tabulka č. 3: Primery pro amplifikaci a sekvenaci DNA čeledi Psalteriomonadidae (HETERF1, HETER1K, 577F, 577R) a domény Archaea (ARCH915F, ARCR1326).

název	sekvence	citace
577F	5'-GCCAGCRGCCGCGG-3'	Elwood et al., 1985
577R	5'-ACCGCGGCKGCTGGC-3'	Elwood et al., 1985
HETERF1	5'-GCTTATTCRAAGATTAAGCCATGYAAA-3'	Pánek et al., 2012
HETER1K	5'-AAYTCAGGGACGTAATCATT-3'	Pánek et al., 2012
ARCH915F	5'-GCTCAGTAACACGTGG-3'	Kubo et al., 2012
ARCR1326	5'-TGTGTGCAAGGAGCAGGGAC-3'	Van Hoek et al., 2000

Tabulka č. 4: Protokol PCR cyklů pro
čeleď Psalteriomonadidae.

počet cyklů	teplota (°C)	čas (min)
1	94	1:00
31	94	1:00
	55	1:00
	72	2:30
1	72	10:00
1	15	∞

Tabulka č. 5: Protokol PCR cyklů Archaea.

počet cyklů	teplota (°C)	čas (min)
1	94	10:00
33	94	0:30
	60	0:30
	72	1:00
1	72	5:00
1	12	∞

3.5 Purifikace PCR produktu

PCR produkty byly purifikovány pomocí kitu GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) podle protokolu výrobce. Alternativně probíhala purifikace pomocí ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent. Po jeho naředění na 1% koncentraci jej byly 2 µl přidány ke každým 5 µl PCR produktu. Tato směs pak byla vložena do PCR cykléru T100 Thermal Cycler (BIO RAD), ve kterém byla ponechána jednu hodinu při 37 °C a následně 15 minut při 80 °C.

3.6 Sekvence DNA

Purifikované PCR produkty byly sekvenované Sangerovou metodou servisně v Laboratoři sekvenace DNA (PřF UK, BIOCEV, Vestec) na přístroji 3130 Genetic analyzer (Applied Biosystems). Vzorokly pro sekvenaci byly připraveny přidáním 1 µl sekvenačního primeru (pro psalteriomonády 577F, 577R, HETERF1, HETER1K; pro symbionty ARCH915F, ARCH1326R; viz výše tabulka č. 3) a 3 µl deionizované PCR vody (Top-Bio) ke 4 µl purifikovaného PCR produktu.

3.7 Fylogenetická analýza

Kontigy sekvencí z jednotlivých sekvenačních běhů byly sestaveny v programu SeqMan 7.0.0 – DNASTAR. Pro fylogenetickou analýzu byly vytvořeny čtyři datasety: (1) Dataset sekvencí genu pro 18S rRNA čeledi Psalteriomonadidae pro určení fylogenetické pozice nových izolátů. Ten obsahoval 37 nových sekvencí, 55 sekvencí z GenBanku

a 125 nepublikovaných sekvencí z diplomové práce K. Uhrové (2017). (2) Dataset sekvencí genu pro 16S rRNA methanogenních symbiontů pro určení jejich fylogenetické pozice. Ten obsahoval 22 nových sekvencí, 148 nejbližších „blast hitů“ z GenBanku a 12 sekvencí čeledi Methanomicrobiaceae z GenBanku, představující outgroup. (3) Dataset sekvencí genu pro 18S rRNA čeledi Psalteriomonadidae pro odhad hostitelské specifity. Ten obsahoval 22 sekvencí izolátů, u nichž byla zjištěna identita symbiontů, a sekvenci izolátu ITZAVL druhu *Sawyeria marylandensis*. (4) Dataset sekvencí genu pro 16S rRNA methanogenních symbiontů pro odhad hostitelské specifity. Ten obsahoval sekvence 22 identifikovaných symbiontů a sekvence druhů *Methanoregula boonei* a *M. formicica*. Alignmenty byly vytvořeny metodou MAFFT na serveru MAFFT 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) s použitím algoritmu G-INS-i a výchozími parametry (Kato et al., 2002). Alignmenty byly ručně upraveny v programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999). Délka finálních datasetů byla 1887, 465, 1699 a 465. Fylogenetická analýza byla provedena metodou maximum likelihood programu RAxML (Stamatakis, 2006) se substitučním modelem GTR+GAMMA+I. Podpora větvení byla odhadnuta pomocí bootstrappingu s 1000 pseudoreplikáty. Genetické distance (nekorigované p distance) byly vypočítány z alignmentu (1) v programu PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002).

3.8 Morfologie

Morfologie buněk byla studována pomocí světelného mikroskopu Olympus BX51 a diferenciálního interferenčního kontrastu (živé buňky) nebo ve světelném poli (nabarvené buňky). Mikrofotografie byly pořízené kamerou Olympus DP71 a zpracované v programu QuickPHOTO CAMERA 2.3. Velikost buněk byla měřena na 30 živých buňkách. Trvalé preparáty byly připraveny pomocí barvení protargolem podle dvou protokolů.

3.8.1 Barvení buněk protargolem podle Nie, 1950

Fixace buněk podle tohoto protokolu probíhá za vlhka, aby nedošlo k vysušení a deformaci buněk. Samotný proces fixace a barvení trval čtyři dny. Před začátkem barvení byla připravena Bouin-Hollandova fixáž rozpuštěním 25 g octanu měďnatého a 40 g kyseliny pikrové v destilované vodě, přidáním 100 ml 40% formaldehydu a doplněním objemu destilovanou vodou do 1 l. 30 ml fixáže bylo přelito do plastové Petriho misky, do které bylo přidáno 1,5 ml ledové kyseliny octové.

První den bylo z dobře narostlé kultury odebráno 1,5 ml sedimentu do 1,5 ml mikrozkušavky, která byla následně stáčena na stolní centrifuze po dobu osmi minut při 500 g. Supernatant byl odlit a 1 μ l peletu byl napipetován na krycí sklíčko o velikosti 15x15 mm. Vedle kapky peletu byl napipetován 1 μ l vaječného bílku naředěný kultivačním médiem v poměru 1:3. Kapka peletu a vaječného bílku byly smíchány dohromady a rozetřeny po celém povrchu krycího sklíčka. Krycí sklíčko bylo poté natřenou stranou dolů vhozeno na hladinu Bouin-Hollandovy fixáže v Petriho misce. Po několika minutách byla sklíčka ve fixáži otočena a potopena na dno a vzorky byly ponechány k fixaci po dobu 14 hodin. Po fixaci byly preparáty převedeny přes 50% ethanol do 70% ethanolu, aby došlo k vymytí fixáže, kde byly uschovány do dalšího dne.

Druhý den byly vzorky převedeny přes 50% ethanol do destilované vody. Následně byla sklíčka vložena a ponechána pět minut v 0,5% roztoku manganistanu draselného a poté pětkrát po dobu 30 sekund opláchnuta v destilované vodě. Opláchnutá sklíčka byla vložena do roztoku 5% kyseliny oxalové, kde byla ponechána po dobu pěti minut. Kyselina oxalová byla ze sklíček opláchnuta pomocí destilované vody. Nakonec byla sklíčka vložena do kádinky s roztokem 1% protargolu (Bayer, I. G. Farbenindustrie Actinengesellschaft) a tenkými měděnými drátky. Sklíčka se v kádince nechala barvit při 37 °C po dobu 48 hodin.

Poslední den byly preparáty dvakrát opláchnuty destilovanou vodou a následně nechány 10 minut v redukčním roztoku (1% hydrochinon a 5% siřičitan sodný) a opláchnuty v destilované vodě, poté pět minut v 1% roztoku kyseliny chlorozlatité a opláchnuty v destilované vodě; pět minut v roztoku 2% kyseliny oxalové a opláchnuty v destilované vodě a 10 minut v 5% roztoku thiosíranu sodného a naposledy opláchnuté. Poté byla sklíčka propírána 20 minut pod tekoucí vodovodní vodou a následně převedena přes alkoholovou řadu (50%–100% ethanol) do xylenu. Na závěr byla sklíčka namontována na podložní sklíčka pomocí DPX Mountant (Sigma).

3.8.2 Barvení buněk protargolem podle Foissner, 2014

Ke kapce sedimentu kultury v jamce podložního sklíčka byla přidána kapka 10% NBF fixativa. Fixativum bylo posléze vymyto destilovanou vodou pomocí mikropipety pod invertovaným mikroskopem. Ke kultuře s vymytým fixativem byla přidána kapka 1% albuminu a následně byly jednotlivé buňky z kultury přeneseny mikropipetou na čisté podložní sklíčko, kde byly ponechány k sušení při pokojové teplotě.

Krycí sklíčka byla po vysušení postupně vkládána do kádinek s 95% roztokem isopropanolu na 15 minut, do 70% isopropanolu na pět minut, do destilované vody na pět minut, do 0,2% roztoku manganistanu draselného na dvě minuty, do destilované vody na 30 sekund, do 2,5% roztoku kyseliny oxalové na tři minuty, třikrát do destilované vody po dobu tří minut a nakonec do 0,4% roztoku protargolu (Bayer, I. G. Farbenindustrie Actinengesellschaft), ve kterém se nechala barvit po dobu 60 minut při 60 °C. Po nabarvení byla sklíčka zkontrolována v mikroskopu a barva byla vyvolána pomocí acetonového developeru. Vývoj barvy byl přerušen omytím sklíček v destilované vodě a v 2,5% roztoku síranu sodného. Nakonec byla sklíčka vložena do 70% a následně do 100% isopropanolu. Po jejich vyjmutí k nim bylo namontováno krycí sklíčko pomocí pryskyřice Euparal (Roth).

3.9 Fluorescenční mikroskopie

Specifická autofluorescence koenzymu F420 endosymbiotických methanogenů byla vizualizována pomocí mikroskopu Olympus BX61 s kamerou Canon EOS 6D s použitím 395–440 nm excitačního filtru, 475–495 nm emisního filtru a 460 nm rozdělovače paprsků (Lambrecht et al., 2017). Získané mikrofotografie byly zpracované pomocí softwaru EOS Utility.

4. Výsledky

4.1 Nové izoláty psalteriomonád

Všechny izoláty, se kterými jsem pro tuto práci pracovala, pocházejí ze sladkovodních anoxických sedimentů. Některé vzorky jsem nasbírala sama, velkou část jsem ale dostala od kolegů – zejména od Daniela Mendez-Sancheze, Ondřeje Pomahače, Ivana Čepičky a Tomáše Pánka. Nových izolátů s populacemi protist bylo získáno celkem 16, kromě psalteriomonád často obsahovaly i zástupce dalších skupin protist, zejména nálevníky. V průběhu kultivace často docházelo k vymizení buněk psalteriomonád z kultury, takže jsem část z nich nestihla zpracovat. Téměř polovina kultur s psalteriomonádami, se kterými jsem pracovala, bylo starších, devět z nich bylo stabilních a dlouhodobě udržovaných na katedře zoologie, osm izolátů bylo zamražených v tekutém dusíku, ze kterého byly úspěšně vymražené. V nových izolátech byly nejvíce zastoupené druhy *Psalteriomonas lanterna*, *Harpagon descissus*, *H. schusteri*, *Sawyeria marylandensis* a *P. magna* (tabulka č. 6). U starších izolátů, které jsem měla k dispozici, jsem ověřila sekvenací části genu pro 18S rRNA identitu, aby bylo jisté, že se jedná o tentýž organismus jako při jejich původnímu popisu v rámci diplomové práce Kristýny Uhrové (2017) – ANASA, KIR, KAKADU, CONGO, VAKANASI, KRIVOKLAT, MAD4C, KORISSION TUN, SUSBARB, CID2, KACCE 22A a KAKADU-HARP; a v rámci studie Pánek et al. (2012) – VT2, VIT3, VIT5 a ITZAVL. Všechny vzorky byly osekvenované pomocí primerů specifických pro čeleď Psalteriomonadidae.

Tabulka č. 6: Nové izoláty zástupců čeledi Psalteriomonadidae; n.a. – nespecifikováno, H. – *Harpagon*, P. – *Psalteriomonas*, S. – *Sawyeria*.

název izolátu	Druh	místo	souřadnice	Lokalita
ALLEGRE	<i>H. schusteri</i>	n.a.	n.a.	sladkovodní sediment
ARMBO	<i>H. descissus</i>	Arménie	N40.4853, E45.2798	bažina u jezera Sevan
ARNOA	<i>H. schusteri</i>	Florence, Arno, Itálie	N43.7655, E11.2640	zaplavený břeh řeky
BAIHOKOU 1A	Psalteriomonadidae sp. 5	Středoafriická republika	N2.8397, E16.4654	n.a.
BAIHOKOU 1B	<i>H. descissus</i>	Středoafriická republika	N2.8397, E16.4654	n.a.
BAIHOKOU 1B1	<i>P. magna</i>	Středoafriická republika	N2.8397, E16.4654	n.a.
BAIHOKOU 1C	<i>H. descissus</i>	Středoafriická republika	N2.8397, E16.4654	n.a.
BAIHOKOU 1C1	<i>H. schusteri</i>	Středoafriická republika	N2.8397, E16.4654	n.a.
BOURKA MOL	<i>H. descissus</i>	Moldavsko	N47.8040, E27.2827	eutrofní rybník, bahno, v blízkosti kravské pastvy
BURELL	<i>H. descissus</i>	Suç Burell, Albánie	N41.5715 E20.0521	sladkovodní sediment
CAPRI	<i>H. schusteri</i>	n.a.	n.a.	n.a.
CEPIMAL	<i>S. marylandensis</i>	Žinkovy, ČR	N49.4691, E13.4858	eutrofní rybník, sediment
CROLOK	<i>H. schusteri</i>	Chorvatsko	n.a.	n.a.
ČISTIČKA	<i>H. schusteri</i>	Troja, Praha, ČR	N50.1156, E14.3966	čistička odpadních vod
DANIEL1	<i>P. lanterna</i>	Atarasquillo, Lerma, Mexiko	N19.3436, W99.5025	sladkovodní bahno
DANIEL5	<i>P. lanterna</i>	Atarasquillo, Lerma, Mexiko	N19.3436, W99.5025	sladkovodní bahno
DANIEL5-HARP	<i>H. descissus</i>	Atarasquillo, Lerma, Mexiko	N19.3436, W99.5025	sladkovodní bahno
DOBREPOLE	<i>P. lanterna</i>	Dobré Pole (Vitice), ČR	N50.0005, E14.9258	sediment odpadních vod
EPOPOLO1	<i>S. marylandensis</i>	Středoafriická republika	N2.8397, E16.4654	n.a.
EPOPOLO2	<i>S. marylandensis</i>	Středoafriická republika	N2.8422, E16.4655	n.a.
GDUKABAS	Psalteriomonadidae sp. 16	Gdukabas, Bhangon, Indie	n.a.	n.a.
JESENICE	<i>P. lanterna</i>	Jesenice, ČR	N49.9727, E14.5122	sladkovodní sediment
KANON ALB C	<i>H. schusteri</i>	Langarica river, Albánie	N40.2580, E20.4656	kaňon řeky

KEŇA 1B	<i>H. descissus</i>	Rift Valley, lake Naivasha, Watalii village, Keňa	S0.8262, E36.3379	břeh jezera s hrochy
KEŇA 4	<i>H. schusteri</i>	Rift Valley, lake Naivasha, Watalii village, Keňa	S0.8262, E36.3379	břeh jezera s hrochy
KEŇA 5	<i>H. schusteri</i>	Rift Valley, lake Naivasha, Watalii village, Keňa	S0.8262, E36.3379	břeh jezera s hrochy
KORTUN	<i>P. lanterna</i>	n.a.	n.a.	n.a.
KRUMA	<i>H. schusteri</i>	Český Krumlov, ČR	N48.8292, E14.3205	eutrofní rybník
KU13	<i>P. magna</i>	Červená Řečice, Dolní Rybník, ČR	N49.5105, E15.1761	sediment rybník
LERMA	<i>H. descissus</i>	Atarasquillo, Lerma, Mexiko	N19.3436, W99.5025	sladkovodní bahno
LERMA1	<i>P. magna</i>	Atarasquillo, Lerma, Mexiko	N19.3436, W99.5025	sladkovodní bahno
LERMA6	<i>P. magna</i>	Atarasquillo, Lerma, Mexiko	N19.3436, W99.5025	sladkovodní bahno
MAURI	<i>H. descissus</i>	Mauricius	n.a.	n.a.
OPATOV	<i>P. lanterna</i>	Opatov, Pardubice, ČR	N49.8485, E16.5000	rybník
ORIBI	<i>H. schusteri</i>	Oribi Gorge Nature reserve (Port Shepstone env), Jihoafrická republika	S30.6972, E30.2677	rašeliniště u potoka
OSGA1	<i>H. schusteri</i>	jezero Trnovačko, Černá Hora	N43.2529, E18.7235	pobřežní sediment jezera
R40 22A	<i>H. descissus</i>	n.a.	n.a.	sladkovodní sediment
STAN2	<i>P. lanterna</i>	Kanada, Vancouver, Beaver lake	n.a.	n.a.
SUCHÁ BIELÁ	<i>H. schusteri</i>	Suchá Biela, SR	N48.9490, E20.3836	potok v rokli Slovenského ráje
VLC POTOK	<i>P. lanterna</i>	Vlčí rokle, Krhanice, ČR	N49.8709, E14.5296	sediment rybník
VYŽLOVKA1	<i>H. schusteri</i>	Vyžlovka, ČR	N49.9819, E14.7855	sladkovodní bahno
YAFW	<i>H. descissus</i>	Mexiko	n.a.	sladkovodní sediment

4.2 Morfologie měňavek a bičíkovců

V rámci studia morfologie jednotlivých buněk byly porovnávány velikost a tvar buňky při aktivní lokomoci, tvar jádra, počet a tvar jadérek a velikost a tvar globule složené z hydrogenozomů a symbiontů. U všech měňavek a u bičíkovců druhu *Psalteriomonas lanterna* byla měřena délka buněk a jejich šířka v nejširší části. Vždy bylo měřeno 30 buněk. Měření byly pouze vybrané izoláty pro porovnání jednotlivých skupin psalteriomonád, determinace byla provedena na základě sekvenace genu pro 18S rRNA. Izoláty představující samostatné nebo unikátní skupiny (GDUKABAS, KU13, BAIHOKOU1A) brzy samovolně zanikly, takže jsem je nestihla změřit.

Pro porovnání morfologie měňavek představující jednotlivé genetické linie druhu *Psalteriomonas lanterna* byly vybrány izoláty MAD4C za linii A, VAKANASI za linii B a izoláty VIT3 a VIT5 za linii C+D (genetické linie druhu *P. lanterna* jsou definovány níže; linie C a D jsou zde reprezentovány pouze jedním izolátem, protože jsou si v rámci druhu *P. lanterna* nejpříbuznější a linie D obsahuje pouze jeden genotyp a byly rozděleny hlavně na základě velké diverzity methanogenních symbiontů; tabulka č. 7). Buňky měňavek izolátu MAD4C jsou přibližně 41 μm dlouhé a 10 μm široké, obsahují jádro s jedním nebo dvěma parietálními jadérky, mají uroid nejčastěji bez filament, mají ostrý přechod mezi hyaloplazmou a granuloplazmou a globule symbiontů je zakulacená a menší než jádro (obr. 11). Měňavky izolátu VAKANASI tvoří široké buňky o průměrné délce 48 μm a šířce 15 μm , jádro obsahuje nejčastěji jedno, někdy ale i dvě parietální jadérka. Na uroidu nebyly pozorované filamenty, hyalinní zóna je dobře patrná a globule symbiontů má podobnou velikost jako jádro (obr. 12). Měňavky izolátu VIT3 tvoří nejdelší a nejprotáhlejší buňky, dlouhé přibližně 55 μm a široké přibližně 12 μm , jádro obsahuje jedno nebo dvě parietální jadérka, uroid někdy vytváří krátké filamenty. Hyalinní zóna je přítomná, často ale není dobře patrný přechod mezi hyaloplazmou a granuloplazmou. Agregát symbiontů je menší než jádro a z jedné strany jádro obklopuje (obr. 13).

Tabulka č. 7: Velikost buněk zástupců čeledi Psalteriomonadidae; hodnoty představují průměrnou délku, šířku v μm nebo poměr délky a šířky, a jejich směrodatnou odchylku, v závorce je uvedené rozpětí velikostí, A – forma měňavky, F – forma bičíkovce, každý izolát měřen z 30 buněk.

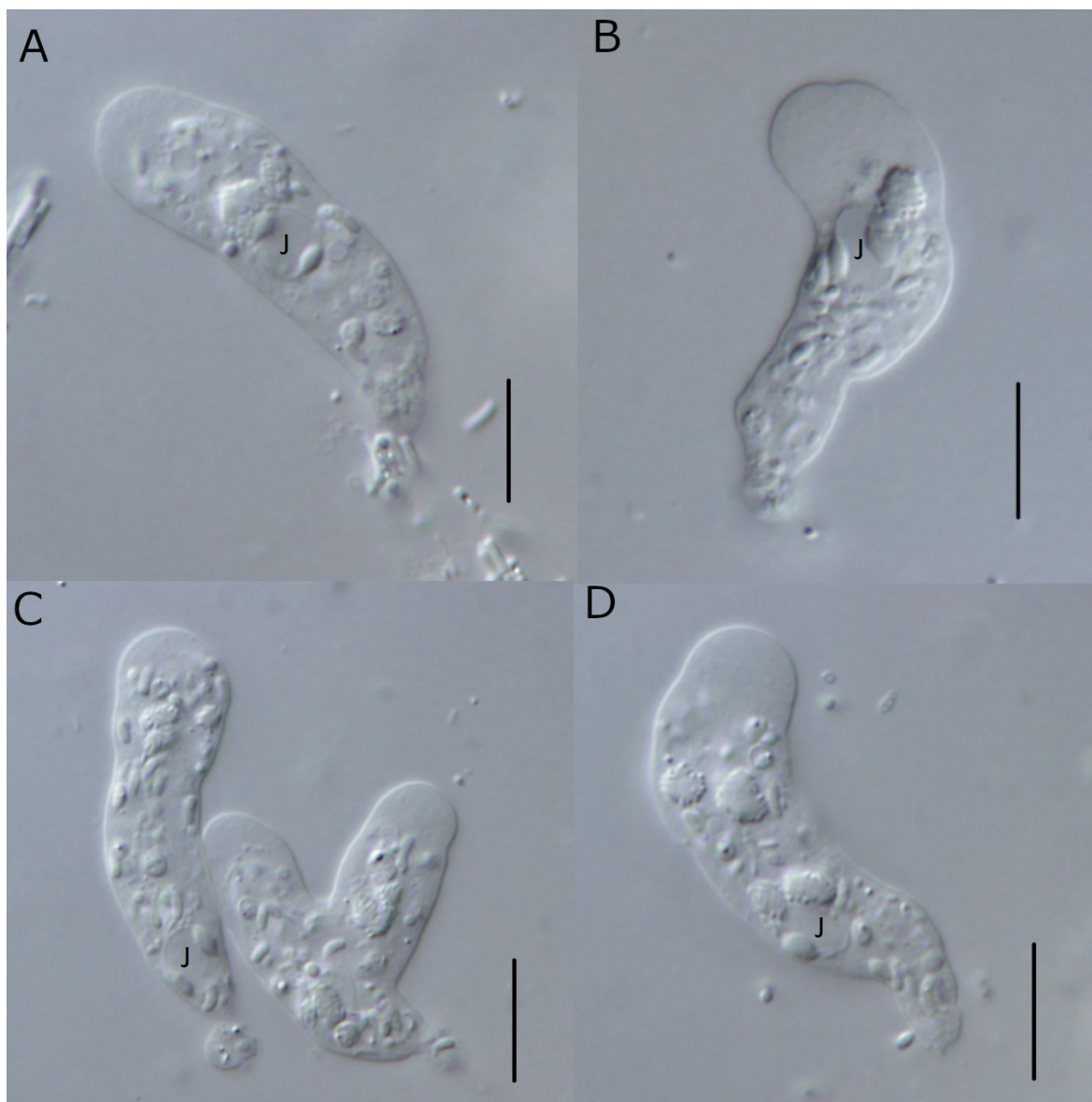
název izolátu	druh (forma)	délka buňky (μm)	šířka buňky (μm)	poměr délky a šířky buňky
ITZAVL	<i>S. marylandensis</i> (A)	31,6±6,8 (23,0-49,0)	7,9±1,3 (5,0-10,0)	4,1±1,1 (2,2-7,0)
MAD4C	<i>P. lanterna</i> (A)	41,3±5,3 (31,0-51,0)	10,6±1,6 (8,0-13,0)	4,0±0,7 (2,4-5,7)
SUSBARB	<i>P. magna</i> (A)	86±12,6 (68,0-113,0)	16,0±2,3 (10,0-22,0)	5,4±0,8 (4,0-7,5)
VAKANASI	<i>P. lanterna</i> (A)	48,3±6,4 (37,0-64,0)	14,8±2,3 (11,0-20,0)	3,3±0,4 (2,5-4,0)
VIT3	<i>P. lanterna</i> (A)	55,6±10,2 (41,0-74,0)	12,0±1,8 (9,0-15,0)	4,7±0,9 (2,9-7,1)
VIT5	<i>P. lanterna</i> (A)	40±5,6 (29,0-53,0)	9,4±1,7 (6,0-13,0)	4,4±0,9 (2,9-6,1)
ANASA2	<i>P. lanterna</i> (F)	28,9±3,0 (22,7-35,0)	17,0±2,0 (10,0-20,6)	1,7±0,3 (1,4-2,5)
DANIEL1	<i>P. lanterna</i> (F)	29,4±3,2 (23,0-36,0)	17,9±2,1 (14,0-22,0)	1,7±0,2 (1,4-1,9)
KIR	<i>P. lanterna</i> (F)	34,2±4,8 (21,0-43,0)	19,6±3,9 (9,0-28,7)	1,8±0,2 (1,4-2,3)
STAN2	<i>P. lanterna</i> (F)	25±2,4 (20,0-29,6)	17,5±2,4 (13,0-22,7)	1,5±0,2 (1,2-1,8)

Druh *P. magna* se v kultuře není příliš často stabilní, byly proto změřeny buňky pouze jednoho izolátu tohoto druhu – SUSBARB (tabulka č. 7). Délka buněk izolátu SUSBARB je průměrně 85 μm . Buňky obsahují jádro s jedním nebo dvěma parietálními jádřky, uroid bez dlouhých filament a velkou globuli symbiontů o velikosti srovnatelnou s velikostí jádra (obr. 14).

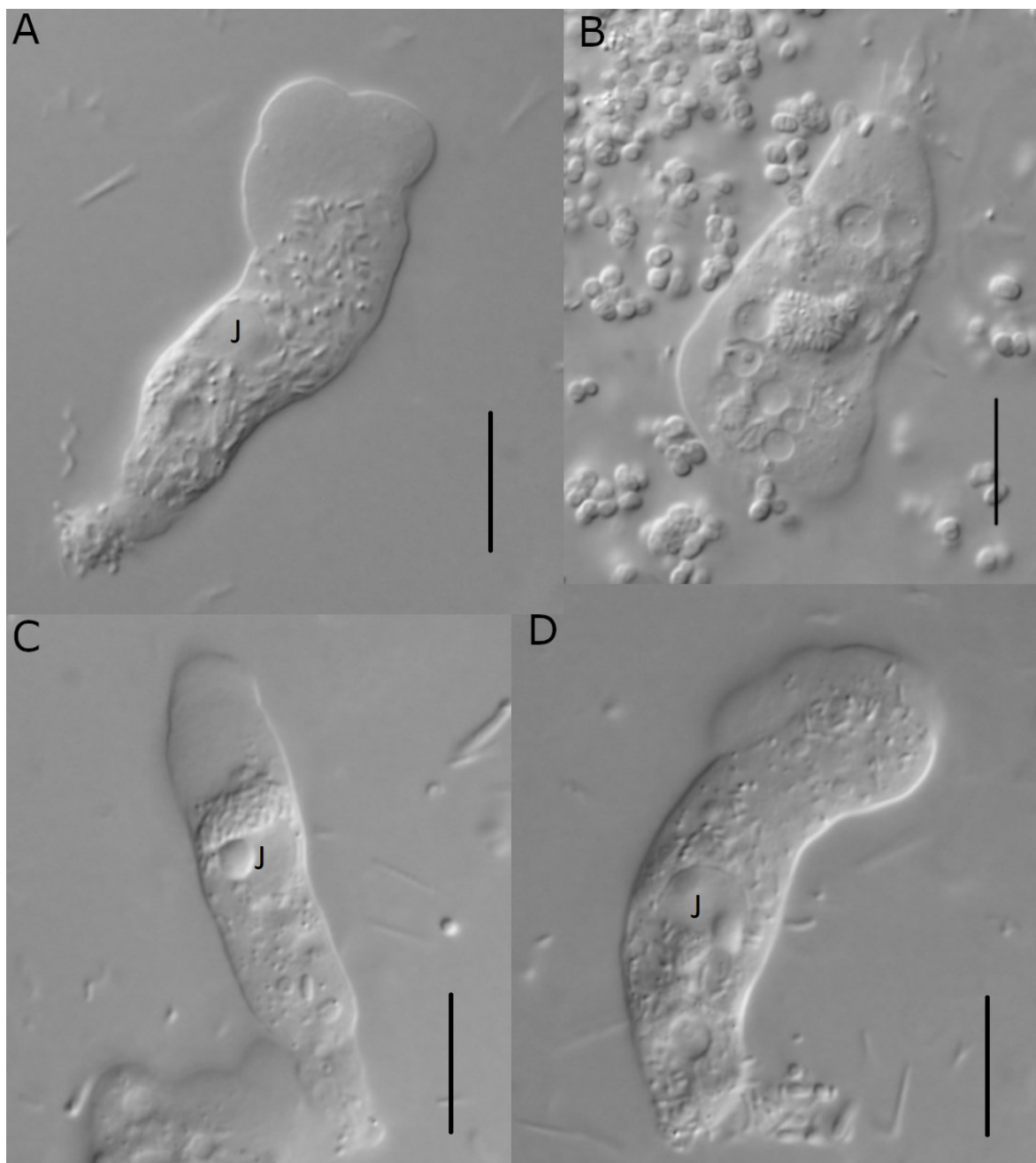
Měřeny byly také buňky druhu *Sawyeria marylandensis* z izolátu ITZAVL. Izolát ITZAVL byl poprvé měřen před více než deseti lety (Pánek et al., 2012), nyní byl přeměřen znovu, aby byla zaznamenána případná změna rozměrů jeho buněk v průběhu let kultivace. Původní velikost izolátu ITZAVL byla průměrně 41 μm , velikost buněk stejného izolátu měřených pro tuto práci byla přibližně 32 μm (tabulka č. 7; Pánek et al., 2012). Buňky tohoto izolátu mají jádro s jedním nebo dvěma parietálními jádřky, uroid často obsahuje filameny, přechod mezi hyaloplazmou a granuloplazmou je dobře patrný a globule symbiontů v buňkách chybí (obr. 15).

Morfologie bičíkovců druhu *Psalteriomonas lanterna* byla dokumentována u buněk izolátů DANIEL1, STAN2, ANASA2 a KIR. Velikost buněk mezi izoláty se výrazně překrývala, průměrně největší buňky byly v izolátu KIR a ty také měly oproti ostatním izolátům buňku nejširší. Průměrně nejmenší byly buňky izolátu STAN2 a byly i nejužší. Délka buňky se mezi izoláty pohybovala průměrně kolem 29 μm a šířka kolem 18 μm . Kromě velikosti buněk byla změřena i velikost globule obsahující hydrogenozomy a symbionty, její šířka se pohybovala kolem 7 μm u všech izolátů (obr. 16). Některé struktury v buňkách bičíkovců byly zvláště obarvením protargolem. Pro barvení byly

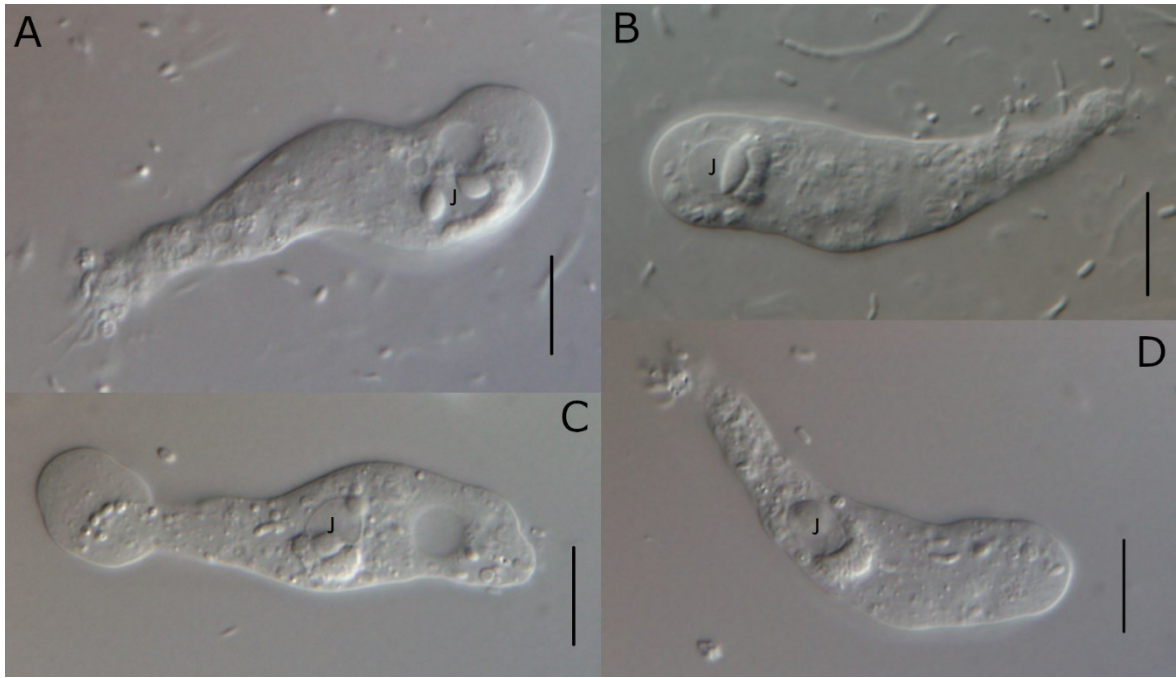
použity dva protokoly – protokol navržený pro bavení střevních bičíkoců (Nie, 1950) a protokol určený pro nálevníky (Foissner, 2014). Protokol pro barvení střevních bičíkoců je časově náročný a výsledek barvení v rámci této práce nebyl uspokojivý, pro porovnání tedy byly použity starší preparáty druhu *P. lanterna* barvené stejným protokolem a získané od školitele. V postupu každého z protokolů je použita jiná fixáž, buňky tak měly po barvení podle každého z protokolů odlišně zvýrazněné různé vnitřní struktury a měly jiný tvar. Barvením pomocí protokolu pro střevní bičíkocce byla nejlépe zobrazená jádra, bičíky a globule z hydrogenozomů a symbiontů. Samotný tvar buňky je díky použité fixáži zakulacený (obr. 16E, F). Barvením pomocí protokolu pro nálevníky byl dobře zobrazený tvar buňky, jádra a někdy bičíky a globule symbiontů (obr. 16C, D).



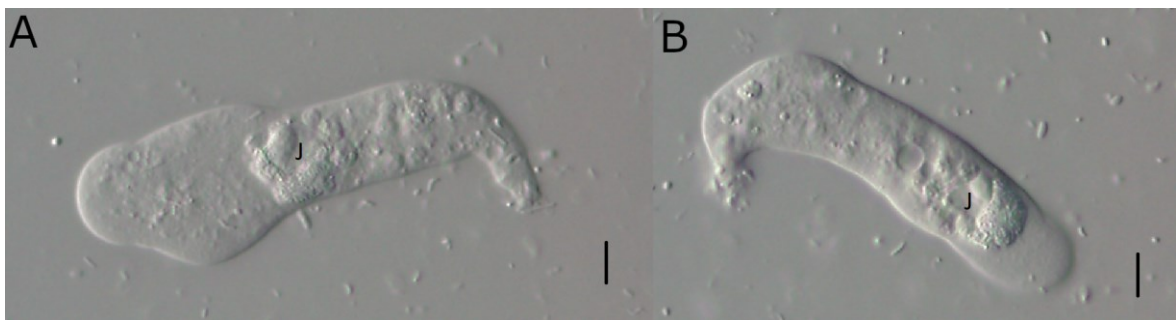
Obr. 11: Měňavky druhu *Psalteriomonas lanterna* – izolát MAD4C (linie A); J – jádro; měřítko 10 μm .



Obr. 12: Měňavky druhu *Psalteriomonas lanterna* – izolát VAKANASI (linie B); J – jádro; měřítko 10 μm .



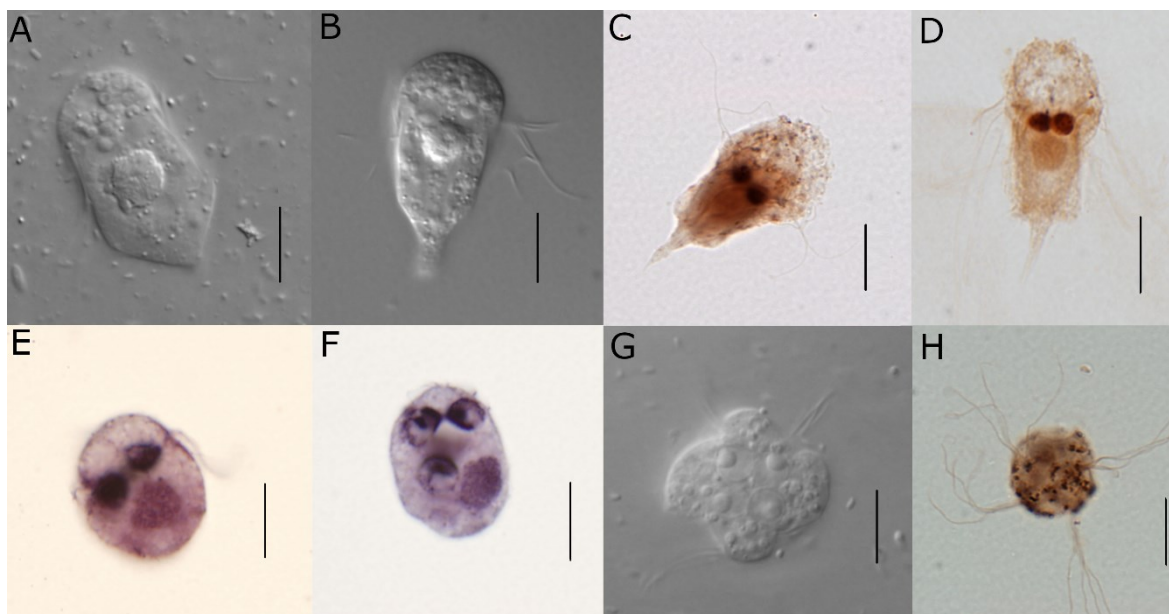
Obr. 13: Měňavky druhu *Psalteriomonas lanterna* – izolát VIT3 (linie D); J – jádro; měřítko 10 μm .



Obr. 14: Měňavky druhu *Psalteriomonas magna* – izolát SUSBARB; J – jádro; měřítko 10 μm .



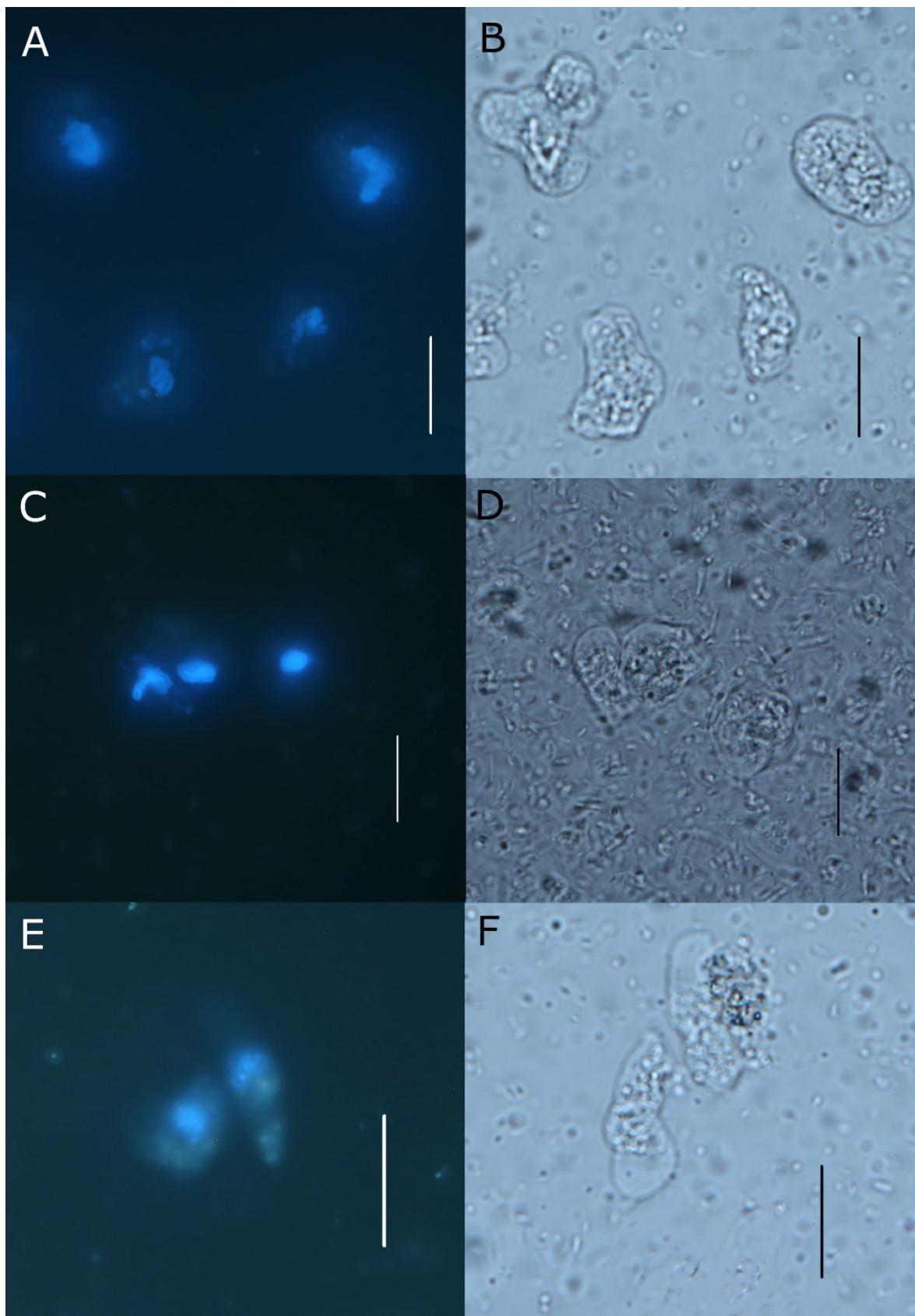
Obr. 15: Měňavky druhu *Sawyeria marylandensis* – izolát ITZAVL; J – jádro; měřítko 10 μm .



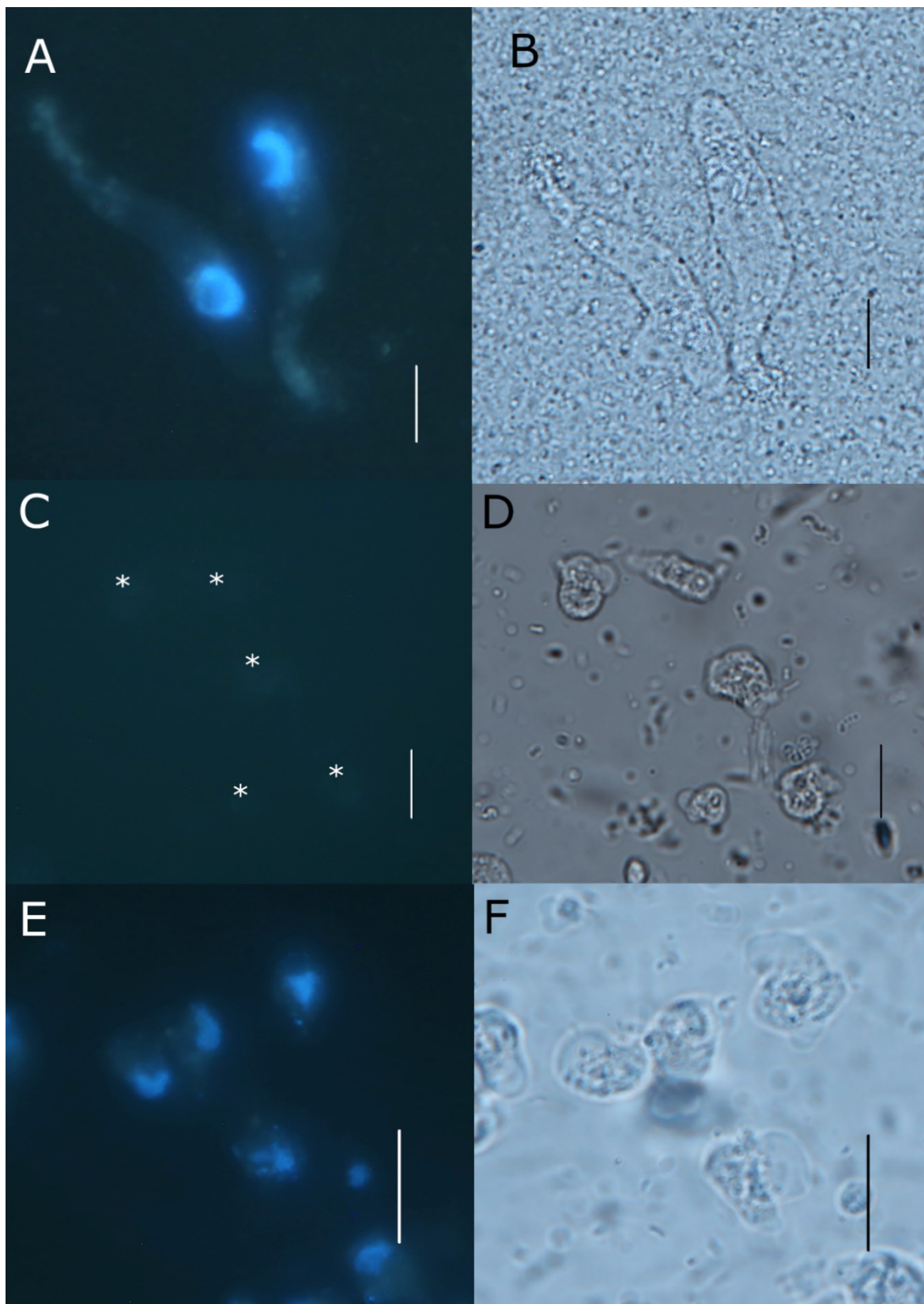
Obr. 16: Bičíkovci druhu *Psalteriomonas lanterna*: A, B: laterální pohled, světelný mikroskop, izolát STAN2; C, D: izolát STAN2, obarvení protargolem, E, F: obarvení protargolem, izolát ANASA2; G: horní pohled, světelný mikroskop, izolát STAN2; H: pohled shora, obarvení protargolem, izolát STAN2, měřítko 10 μm .

4.3 Identifikace methanogenních symbiontů

Kultury, ve kterých se vyskytovaly druhy *Psalteriomonas lanterna*, *P. magna*, *Sawyeria marylandensis* a několik vzorků se zástupci rodu *Harpagon*, byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu pro zjištění přítomnosti (a případně nepřítomnosti) methanogenních symbiontů. Autofluorescenční signál pozorovaný u druhů *P. lanterna*, *P. magna* a izolátu KAKADU (*Psalteriomonadidae* sp. 5) byl nejvíce soustředěn do jednoho místa v rámci celé buňky, kde se vyskytuje agregát symbiontů, slabší signál byl patrný i z dalších částí buňky, ten pravděpodobně představuje prokaryoty v potravních vakuolách (obr. 17, 18). Symbionti se vyskytovali ve všech izolátech reprezentující druhy *P. lanterna* a *P. magna* a u jednoho izolátu druhu *Psalteriomonadidae* sp. 5 (izolát KAKADU). U ostatních izolátů druhu *Sawyeria marylandensis* a rodu *Harpagon* methanogeni zaznamenaní nebyli. Vzorky, u kterých byli identifikováni methanogeni, byly následně zpracovány a byla osekvenována část genu pro 16S rRNA symbiontů pomocí primerů specifických pro Archaea pro identifikaci endosymbiontů. Všechny sekvence získané Sangerovým sekvenováním jasně zobrazovaly pouze jednoho symbionta, který u všech izolátů představuje zástupce methanogenních archaea rodu *Methanoregula* (*Methanoregulaceae*, *Methanomicrobiales*).



Obr. 17: Živé buňky druhu *Psalteriomonas lanterna* zobrazující autofluorescenci symbiontů měňavek (levá část) a vzhled stejných buněk při zobrazení ve světelném poli (pravá část) – A, B: MAD4C; C, D: VAKANASI; E, F: VIT5; měřítko: 20 μm .



Obr. 18: Živé buňky psalteriomonád zobrazující autofluorescenci symbiontů měňavek (levá část) a vzhled stejných buněk při zobrazení ve světelném poli (pravá část) – A, B: SUSBARB (*Psalteriomonas magna*); C, D: ITZAVL (*Sawyeria marylandensis*), E, F: KAKADU (*Psalteriomonadidae* sp. 5); měřítko: 20 μm, hvězdičkou (*) jsou označené buňky, ze kterých nejde žádný fluorescenční signál.

4.4 Fylogenetické analýzy

4.4.1 Hostitelé – čeleď *Psalteriomonadidae*

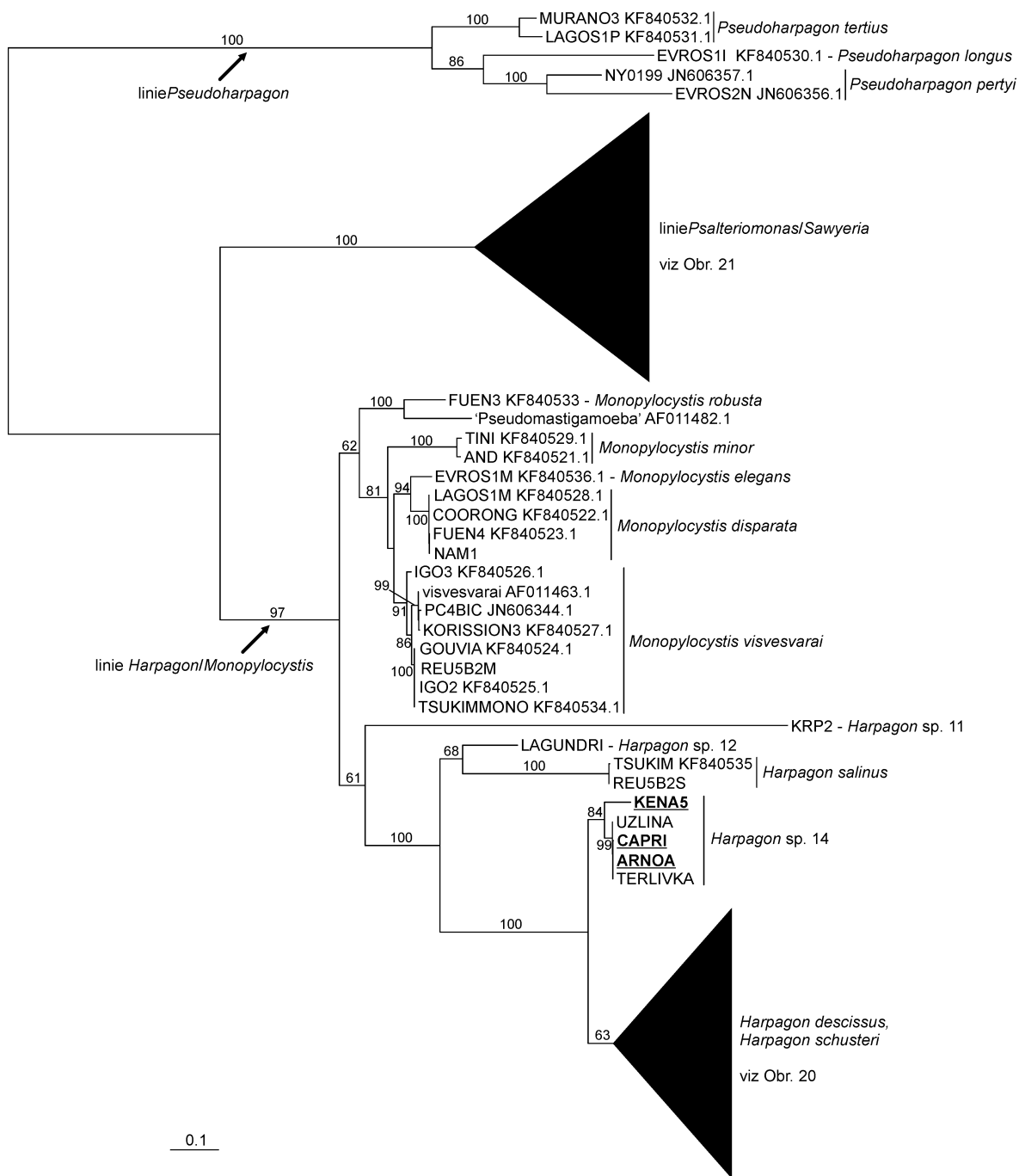
Všechny nově získané izoláty na fylogenetickém stromě genu pro 18S rRNA umístily do již známých druhů (popsaných i dosud nepopsaných) čeledi *Psalteriomonadidae*. Výjimkou jsou izoláty GDUKABAS a KU13, které jsou v rámci této práce označovány jako *Psalteriomonadidae* sp. 16 a 17. Resekvenací v minulosti již sekvenovaných izolátů se ve všech případech potvrdila jejich původní identita. Celkem bylo získáno a úspěšně osekvenováno 37 nových sladkovodních zástupců čeledi *Psalteriomonadidae* a resekvenováno bylo 18 izolátů.

Fylogenetický strom genu pro 18S rRNA byl pro přehlednost byl rozdělen na tři části (obr. 19, 20, 21). Topologie čeledi *Psalteriomonadidae* je z velké části stejná jako v diplomové práci K. Uhrové (2017) a obsahuje tři hlavní linie – linii *Psalteriomonas/Sawyeria*, linii *Harpagon/Monopylocystis* a linii rodu *Pseudoharpagon*. Bootstrapová podpora (BP) monofylie všech těchto linií je nejméně 97.

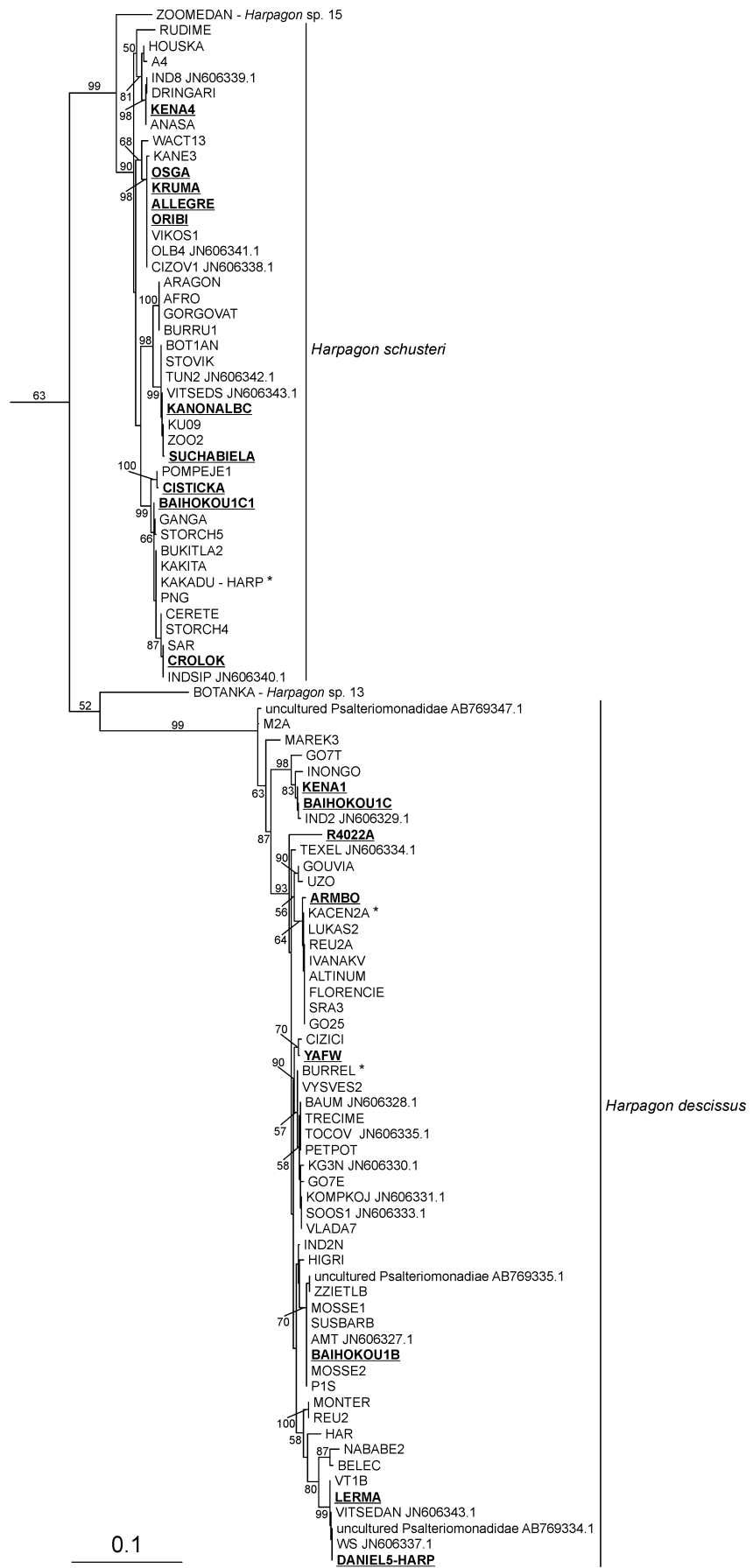
Vnitřní topologie a statistická podpora v rámci linie *Harpagon/Monopylocystis* vyšla srovnatelně s prací K. Uhrové (2017), rozdílem je izolát BOTANKA, představující druh *Harpagon* sp. 13, původně sesterský druhu *Harpagon* sp. 14, který se v mé práci umístil jako sesterská skupina druhu *Harpagon descissus*, ale pouze s nízkou podporou (BP 52). Rozdílně se také umístil druh *Harpagon* sp. 14, ke kterému se přiřadily tři nové izoláty – KENA5, CAPRI a ARNOA. Nyní tvoří bazálnější linií sesterskou k linii vedoucí k dvěma popsáným druhům rodu *Harpagon* – *H. schusteri* a *H. descissus*, zatímco dříve byl sesterskou linií pouze druhu *H. schusteri* (obr. 20).

V rámci této práce byla největší pozornost věnována linii *Psalteriomonas/Sawyeria*, jejíž vnitřní topologie je opět téměř totožná s topologií této linie z práce K. Uhrové (2017; obr. 21). Linie *Psalteriomonas/Sawyeria* se dále dělí na tři linie, mezi kterými nejsou rozřešené vzájemné vztahy. První linie představuje druh *Psalteriomonadidae* sp. 1, který je reprezentován izolátem VLADA7SW. Druhá linie obsahuje druhy *Psalteriomonadidae* sp. 2 a 3, dvě environmentální sekvence a nově osekvenovaný izolát GDUKABAS. Ten pravděpodobně představuje nový druh *Psalteriomonadidae* sp. 16. Zbytek studovaných izolátů se přiřadil do třetí linie, která je reprezentována zejména rody *Psalteriomonas* a *Sawyeria*. Ta obsahuje tři dobře podpořené skupiny (BP 84 a více), mezi kterými zatím nejsou rozřešené vztahy – skupina obsahující druhy *Psalteriomonadidae* sp. 7 a 8, skupina

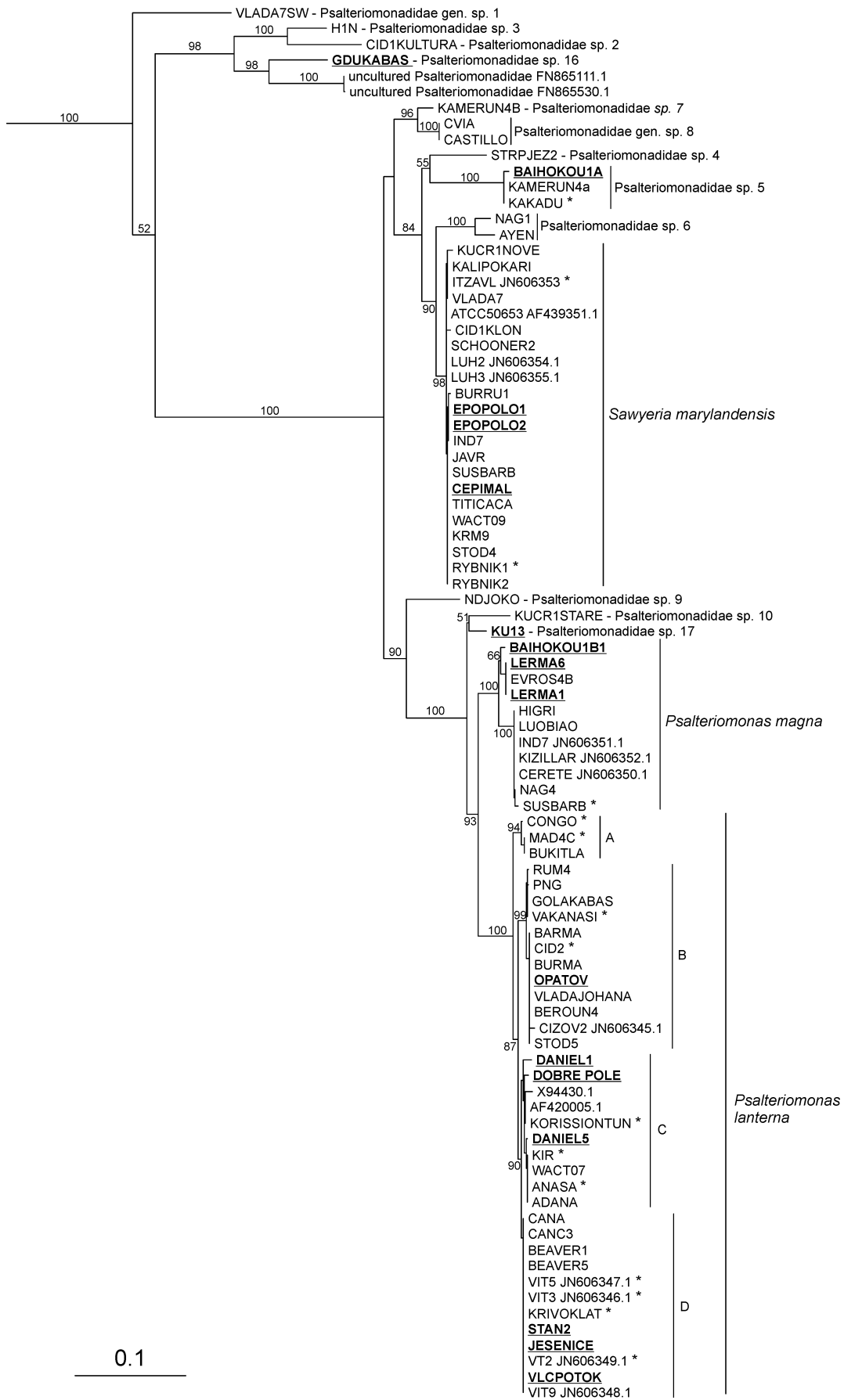
zahrnující rod *Sawyeria* a druhy Psalteriomonadidae sp. 4-6 a nakonec skupina zahrnující rod *Psalteriomonas* a druhy Psalteriomonadidae sp 9, 10 a 17 (poslední jmenovaný je nově objevený). V rámci skupiny s rodem *Sawyeria* byl k novému druhu Psalteriomonadidae sp. 5 (v práci K. Uhrové označený jako *Sawyeria* sp. 5) přidán jeden izolát a k druhu *S. marylandensis* byly přidány tři izoláty. V rámci skupiny zahrnující rod *Psalteriomonas* byly do druhu *P. magna* zařazeny tři nové izoláty a do druhu *P. lanterna* 7 nových izolátů. V rámci druhu *P. lanterna* je patrná genetická diverzita a pro účely dalšího zkoumání zejména specifity methanogenních symbiontů, byl tento druh rozdělen na čtyři odlišné genetické linie A-D. Potenciálně nový druh Psalteriomonadidae sp. 17, představovaný izolátem KU13 s měňavkovitými buňkami, se umístil jako sesterská větev k druhu Psalteriomonadidae sp. 10, příbuznost těchto dvou linií ale nezískala dostatečnou podporu (BP 51)



Obr. 19: Fylogenetický strom čeledi Psalteriomonadidae sestavený na základě genu pro 18S rRNA v programu RAxML s pomocí modelu GTR+GAMMA+I; nové izoláty jsou označeny tučně a jsou podtrženy; hvězdičkou (*) jsou označeny starší izoláty, které byly resekvenovány; číselné hodnoty reprezentují statistickou podporu v bootstrapových hodnotách vyšší než 50.



Obr. 20: Část fylogenetického stromu čeledi Psalteriomonadidae zobrazující druhy *Harpagon descissus*, *H. schusteri* a *H. sp. 13* (viz obr. 19).



Obr. 21: Část fylogenetického stromu čeledi Psalteriomonadidae zobrazující linii *Psalteriomonas/Sawyeria* (viz obr. 19).

V linii *Psalteriomonas/Sawyeria* byly vypočítané genetické distance (nekorigované p distance) mezi druhy a uvnitř jednotlivých druhů (tabulka č. 8). U druhu *Psalteriomonas lanterna* byly spočítány genetické distance v rámci jednotlivých genetických linií A-D a mezi jednotlivými liniemi (tabulka č. 9). Genetické distance v rámci druhu představují největší vzdálenost mezi jednotlivými izoláty stejného druhu. Mezidruhové distance představují nejmenší vzdálenosti mezi izoláty dvou druhů.

Tabulka č. 8: Genetické distance (nekorigované p distance) druhů linie *Psalteriomonas/Sawyeria*; P. l. – *Psalteriomonas lanterna*; P. m. – *Psalteriomonas magna*; S. m. – *Sawyeria marylandensis*; P. – *Psalteriomonadidae*; n.a. – z daného druhu je k dispozici sekvence pouze jednoho izolátu; šedě jsou podbarvené největší vzdálenosti v rámci jednoho druhu, nepodbarvené hodnoty představují nejmenší genetickou vzdálenost mezi jednotlivými druhy.

	P. l.	P. m.	P. sp. 10	P. sp. 17	P. sp.8	P. sp. 7	S. m.	P. sp. 6	P. sp. 4	P. sp. 5	P. sp. 9	P. sp. 3	P. sp. 2	P. sp. 16	P. sp. 1
P. l.	0,021														
P. m.	0,035	0,017													
P. sp. 10	0,055	0,051	n.a.												
P. sp. 17	0,045	0,038	0,040	n.a.											
P. sp. 8	0,094	0,092	0,100	0,090	0,000										
P. sp. 7	0,088	0,083	0,095	0,085	0,027	n.a.									
S. m.	0,100	0,089	0,102	0,092	0,057	0,053	0,008								
P. sp. 6	0,119	0,113	0,120	0,115	0,079	0,076	0,043	0,025							
P. sp. 4	0,111	0,104	0,115	0,109	0,073	0,070	0,054	0,073	n.a.						
P. sp. 5	0,115	0,107	0,115	0,113	0,082	0,085	0,064	0,088	0,079	0,004					
P. sp. 9	0,091	0,084	0,090	0,079	0,080	0,073	0,075	0,099	0,096	0,096	n.a.				
P. sp. 3	0,197	0,201	0,198	0,202	0,183	0,184	0,178	0,187	0,194	0,182	0,187	n.a.			
P. sp. 2	0,202	0,199	0,196	0,202	0,195	0,190	0,185	0,191	0,200	0,192	0,196	0,072	n.a.		
P. sp. 16	0,194	0,195	0,196	0,193	0,178	0,182	0,180	0,197	0,197	0,185	0,192	0,109	0,127	n.a.	
P. sp. 1	0,168	0,168	0,172	0,174	0,163	0,163	0,162	0,184	0,181	0,167	0,171	0,146	0,149	0,148	n.a.

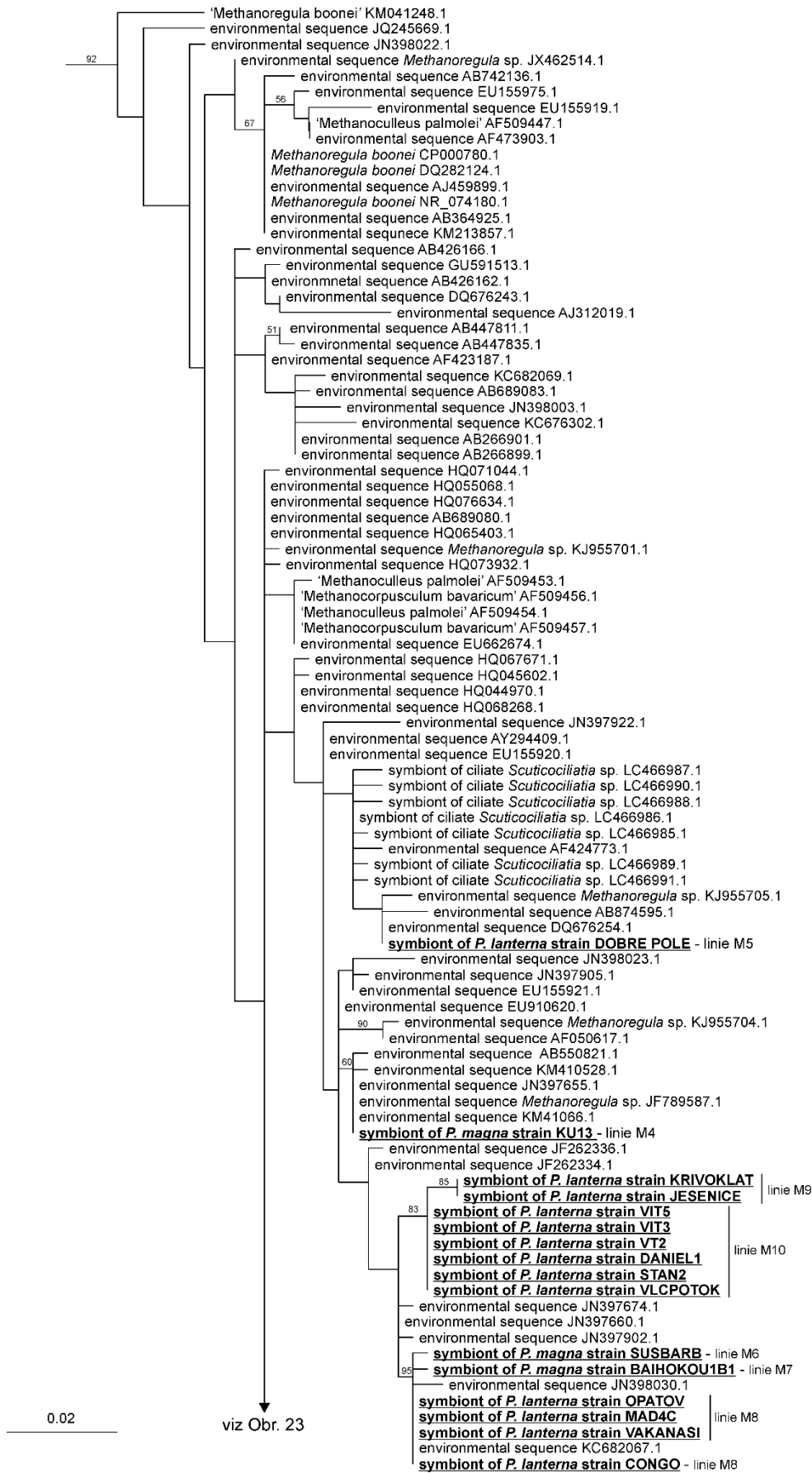
Tabulka č. 9: Genetické distance (nekorigované p distance) linií A-D druhu *Psalteriomonas lanterna*; šedě jsou podbarvené největší vzdálenosti v rámci jedné genetické linie, nepodbarvené hodnoty představují nejmenší genetickou vzdálenost mezi jednotlivými liniemi.

	PIA	PIB	PIC	PID
PIA	0,003			
PIB	0,021	0,007		
PIC	0,021	0,020	0,009	
PID	0,021	0,019	0,008	0,000

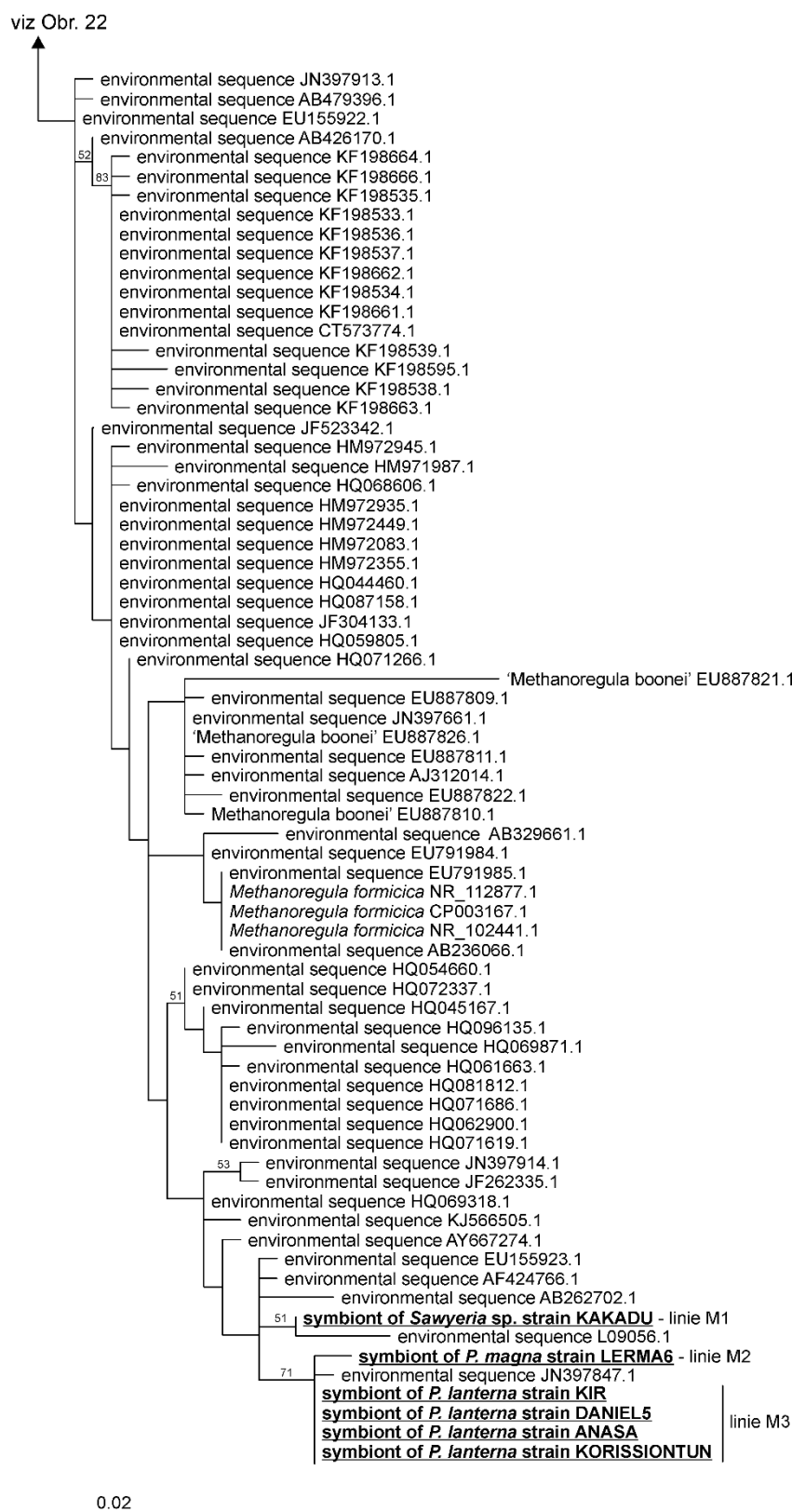
4.4.2 Methanogenní symbionti psalteriomonád

Pro fylogenetickou analýzu methanogenních symbiontů psalteriomád druhu *Psalteriomonas lanterna*, *P. magna* a Psalteriomonadidae sp. 5 (izolát KAKADU) byla část genu pro 16S rRNA amplifikována pomocí specifických primerů pro Archaea z DNA buněk hostitelů, které byly ručně jednotlivě vybírány a omývány od prokaryotických buněk. Symbionti izolátů ANASA a KORISSION TUN byli sekvenováni vícekrát. Izolát ANASA obsahuje buňky druhu *P. lanterna* tvořící formu měňavky i formu bičíkovce, pro srovnání symbiontů tak byly získány sekvence z obou forem. Obě tyto sekvence byly totožné a představují tak stejného symbionta. Izolát KORISSION TUN je udržován ve dvou oddělených kulturách a pro ověření podobnosti symbiontů buněk psalteriomonád v těchto kulturách byly osekvenovány obě. Také obě tyto kultury jednoho izolátu sdílejí stejného symbionta.

Všichni symbionti psalteriomonád se umístili do rodu *Methanoregula*. Fylogenetický strom tohoto rodu byl sestaven na základě datasetu dlouhého 465 pozic, jako outgroup byla použita skupina Methanomicrobiaceae, obsahující rody *Methanoculleus*, *Methanogenium*, *Methanofollis*, *Methanocalculus*, *Methanoplanus*, *Methanolacinia* a *Methanomicrobium* a rody sesterské rodu *Methanoregula* – *Methanosphaerula* a *Methanolinea*. Pro přehlednost byl strom rozdělen na dvě části (obr. 22, 23) skupiny sloužící jako outgroup byly z obrázku 22 vynechány. Topologie stromu obecně nebyla podpořena (BP < 51), protože byla sestavena na základě relativně krátkého úseku genu pro 16S rRNA. I přesto existovala mezi nově určenými sekvencemi symbiontů výrazná variabilita. Symbionti psalteriomonád se umístili do dvou odlišných klastrů. Celkem bylo osekvenováno 10 unikátních genotypů symbiontů (M1-M10), které se umístili do různých míst stromu v rámci výše zmíněných klastrů. Žádná ze sekvencí není identická s popsány druhy rodu *Methanoregula* – *M. boonei* a *M. formicica* – a všechny jsou v blízkosti environmentálních sekvencí. Sekvence symbiontů izolátu DOBRE POLE druhu *Psalteriomonas lanterna* se umístila do blízkosti sekvencí symbiontů skutikociliátů.



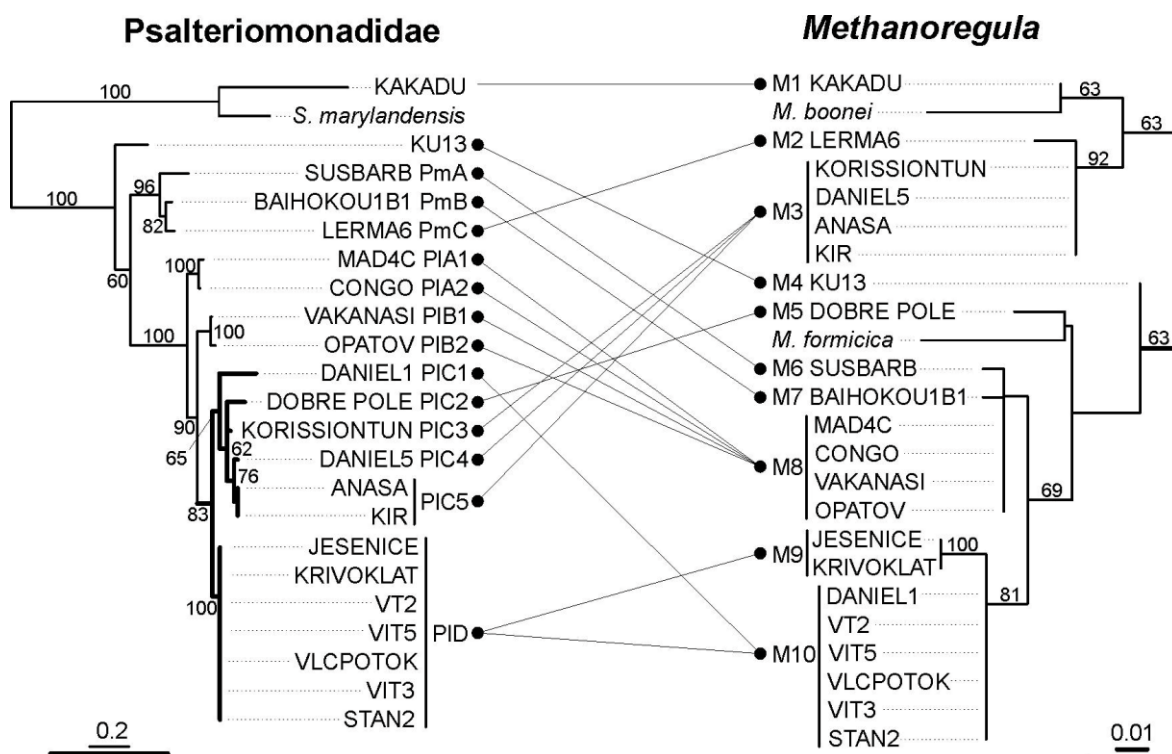
Obr. 22: Část fylogenetického stromu rodu *Methanoregula*, sestavený na základě genu pro 16S rRNA v programu RAxML s pomocí modelu GTR+GAMMA+I; nové izoláty jsou označené tučně a jsou podtržené; číselné hodnoty reprezentují statistickou podporu v bootstrapových hodnotách.



Obr. 23: Část fylogenetického stromu rodu *Methanoregula*, sestavený na základě genu pro 16S rRNA v programu RAxML s pomocí modelu GTR+GAMMA+I; nové izoláty jsou označené tučně a jsou podtržené; číselné hodnoty reprezentují statistickou podporu v bootstrapových hodnotách.

4.5 Specifita symbiontů a hostitelů

Pro odhadnutí míry specifity symbiontů vůči hostiteli byly provedeny další dvě fylogenetické analýzy sekvencí hostitelů a symbiontů. První obsahovala sekvence genu pro 18S rRNA všech izolátů psalteriomonád, u kterých byla známá identita symbiontů, a druh *Sawyeria marylandensis*, který symbionty nemá. Druhá analýza obsahovala všechny nově určené sekvence genu pro 16S rRNA symbiontů psalteriomonád a druhy *Methanoregula boonei* a *M. formicica*. Sekvence hostitelů byly rozděleny do 15 unikátních variant (genotypů): KAKADU (*Psalteriomonadidae* sp. 5), KU13 (*Psalteriomonadidae* sp. 17), PmA, PmB, PmC (*Psalteriomonas magna*), PlA1, PlA2 (*Psalteriomonas lanterna* linie A), PlB1, PlB2 (*Psalteriomonas lanterna* linie B), PlC1, PlC2, PlC3, PlC4, PlC5 (*Psalteriomonas lanterna* linie C) a PlD (*Psalteriomonas lanterna* linie D). Unikátní sekvence symbiontů byly rozděleny do deseti genotypů M1-M10, které byly definovány v předchozí kapitole. Fylogenetické stromy hostitelů a symbiontů byly srovnány pomocí čar vedoucí od sekvencí hostitelů k sekvencím symbiontů (obr. 24). Genotypy KAKADU, KU13, všechny genotypy druhu *P. magna* (PmA-C) mají unikátní symbionty. Linie *Psalteriomonas lanterna* A a B sdílejí symbionty o genotypu M8. Genotypy PlC3-PlC5 hostitele sdílejí genotyp M3 jediného symbionta; hostitelé genotypu PlD představující sedm sekvenčně totožných izolátů hostí dva blízce příbuzné symbionty o genotypech M9 a M10. Izolát genotypu PlC1 sdílí symbionta s genotypem PlD.



Obr. 24: Srovnání fylogenetického stromu hostitelů a symbiontů sestaveného z unikátních genotypových sekvencí genu pro 16S rRNA (*Methanoregula*) a 18S rRNA (Psalteriomonadidae) v programu RAXML s pomocí modelu GTR+GAMMA+I.

5. Diskuze

5.1 Nové izoláty čeledi Psalteriomonadidae

Celkem bylo kultivováno 37 nových sladkovodních izolátů měňavek a bičíkovců z kmene Heterolobosea. Všechny izoláty se na fylogenetickém stromě genu pro 18S rRNA umístily do dvou ze tří linií čeledi Psalteriomonadidae, které byly definované v rámci diplomové práce K. Uhrové (2017), a to linie *Psalteriomonas/Sawyeria* a *Monopylocystis/Harpagon*. Do třetí linie, kterou představuje rod *Pseudoharpagon*, se nezařadil žádný z kultivovaných izolátů, což odpovídá tomu, že všechny druhy tohoto rodu jsou mořské nebo brakické.

Do linie *Monopylocystis/Harpagon* se umístilo 21 nových izolátů a všechny se přiřadily do rodu *Harpagon*, což opět koresponduje s místem jejich původu ze sladkovodních sedimentů (všichni známí zástupci rodu *Monopylocystis* jsou pouze mořští nebo brakičtí; Pánek et al., 2014a). Většina izolátů rodu *Harpagon* představuje druhy *H. schusteri* a *H. descissus*, zajímavé jsou ale tři izoláty (KENA5, CAPRI a ARNOA), které společně s dvěma staršími izoláty představují nepopsaný druh označený jako *Harpagon* sp. 14 (Uhrová, 2017). Druhy *H. schusteri* a *H. descissus* si jsou morfologicky velmi podobné (odlišují se pouze přítomností formy s protaženější zadní částí některých buněk u *H. descissus*), stejně je tomu tak u druhu *Harpagon* sp. 14, jehož morfologie byla krátce popsána pouze na základě jednoho izolátu – TERLIVKA – jenž se od druhů *H. schusteri* a *H. descissus* odlišuje menší variabilitou tvaru buněk (Uhrová, 2017). Stabilní kultura izolátu KENA5 tohoto druhu je stále k dispozici na pracovišti školitele, proto by bylo dobré v budoucnu zdokumentovat jejich morfologii; tato práce samotná nebyla na morfologii rodu *Harpagon* zaměřená.

Do line *Psalteriomonas/Sawyeria* se přiřadilo 16 nových izolátů. Byly získány nové izoláty všech tří dosud popsáných druhů patřících do této line – *Psalteriomonas lanterna*, *P. magna* a *Sawyeria marylandensis*. Izoláty, u kterých byla pro srovnání zkoumána morfologie, zhruba odpovídaly popsáným druhům velikostí, přítomností globule symbiontů i charakterem bičíkovců typických pro druh *P. lanterna*. Tři z nových izolátů (GDUKABAS, BAIHOKOU1A a KU13) se nepřihřadily k žádnému z popsáných druhů a představují společně s několika staršími izoláty samostatné nové druhy Psalteriomonadidae sp. 16, 5 a 17. Tyto izoláty byly v kultuře nestabilní a brzy zanikly, jejich morfologie tak nebyla studována. Genetické distance izolátů GDUKABAS a BAIHOKOU1A od nejbližších linií jsou 0,12 a 0,082, jsou tedy vzdálenější, než si jsou

dva popsané druhy rodu *Psalteriomonas* (*P. lanterna* a *P. magna*), mezi nimiž je vzdálenost 0,035. Izolát KU13 se umístil jako sesterská linie k jednomu stávajícímu izolátu – KUCR1STARE – představujícímu druh *Psalteriomonadidae* sp. 10 (dříve *Psalteriomonas* sp. 10) tato pozice je ale podpořena nízkou statistickou podporou a navíc jejich genetická distance má hodnotu vyšší, než 0,04; jedná se tak proto pravděpodobně o nový druh, který je zde označený jako *Psalteriomonadidae* sp. 17. Izolát KU13 byl získán v závěru prací na tomto projektu a také rychle zanikl, jeho morfologii jsem proto nestihla zdokumentovat.

5.2 Diverzita v rámci druhu *Psalteriomonas lanterna*

Tato diplomová práce byla primárně zaměřena na studium druhu *Psalteriomonas lanterna*. Ten je geograficky široce rozšířený a je zajímavý tím, že je schopný tvořit v rámci svého životního cyklu formu měňavky i bičíkovce. Bičíkovci mají na rozdíl od ostatních zástupců čeledi *Psalteriomonadidae* zmnožené buněčné struktury – mají například čtyři ventrální rýhy, ze kterých vychází 16 bičíků a čtyři jádra. Navíc obsahují velmi nápadnou globuli z hydrogenozomů a symbiontů. Na základě fylogenetické analýzy genu pro 18S rRNA byl druh *P. lanterna* rozdělen na čtyři genetické linie, A-D. Pro genetické linie byly spočítány genetické distance. Linie A je od všech ostatních linií nejdálčenější. Linie C má v rámci svých izolátů největší variabilitu (genetická distance 0,09) a mezi linií C a D je genetická vzdálenost pouze 0,08 a v rámci linie D není žádná variabilita. Linie C a D byly rozděleny především na základě unikátních symbiontů, ale pouze na základě vzdáleností v rámci těchto dvou linií a mezi nimi, by bylo možné rozdělit linii C na několik dalších linií nebo naopak celou linii C sloučit s linií D do jedné. Všechny izoláty linie A pocházejí pouze z tropických nebo subtropických oblastí. Naopak zástupci ostatních linií jsou téměř kosmopolitní, žádný izolát ale nepochází z tropické oblasti. Na základě těchto odlišných genetických linií druhu *P. lanterna* by jednotlivé linie mohly představovat až čtyři odlišné druhy. Pro popis druhu je ale nutné v rámci čeledi *Psalteriomonadidae* definovat druhy i na základě morfologie. Morfologie buněk z linie A a B je ale zatím známá pouze ze dvou izolátů a také je nedostatek stabilně udržovaných kultur těchto linií, je proto nutné získat stabilní kultury dalších izolátů.

Buňky měňavek izolátů představující linie A, B a C+D druhu *P. lanterna* (MAD4C, VAKANASI, VIT3) jsou velikostně rámcově srovnatelné. Počet jader, jadérek i vzhled

uroidu je u studovaných izolátů také podobný. Buňky izolátu VAKANASI jsou v porovnání s ostatními izoláty vzhledem ke své délce mnohem širší a buňky izolátu VIT3 jsou zase velmi protáhlé. Také se liší velikostí globule symbiontů – u izolátu MAD4C je nejmenší a u izolátu VAKANASI je největší. Izolát VAKANASI byl ale kultivován v jiném médiu, je tedy možné, že byl vzhled buněk přizpůsoben tomuto prostředí. Izolát VIT3 se od izolátu MAD4C a VAKANASI odlišuje méně patrnou hyalinní zónou některých buněk, zatímco u ostatních dokumentovaných izolátů je hyalinní zóna dobře rozeznatelná od granuloplazmy. Všechny tyto rozdíly ale nejsou nijak zásadní a pouze na jejich základě nelze říci, že linie A-D představují různé druhy; toto je ale třeba ověřit na větším počtu izolátů.

Druh *Psalteriomonas magna* se od druhu *P. lanterna* morfologicky liší zejména velikostí buňky – druh *P. lanterna* je až o polovinu menší. Velikost buněk měřeného izolátu SUSBARB se se svojí průměrnou délkou 85 μm odlišuje od průměrné velikosti buněk typového izolátu KIZILLAR, jenž dosahují průměrné délky 70 μm , rozpětí jejich délek se ale překrývá (Pánek et al., 2012).

Morfologie buněk bičíkovců druhu *Psalteriomonas lanterna* byla dosud studována pouze na jediném (typovém) izolátu, který spadá do genetické linie C, v našich kulturách jsou ale izoláty vytvářející bičíkatou formu i z linie D, bylo tedy žádoucí popsat morfologii bičíkovců z dalších izolátů a porovnat je mezi sebou. Morfologie byla dokumentována na čtyřech izolátech (ANASA2, STAN2, DANIEL1 a KIR), z genetických linií C a D, které jako jediné tvořily bičíkaté formy buňky. V lini A a B žádní bičíkovci pozorování nebyly, ale je možné, že tomu tak je kvůli malému množství izolátů z těchto linií, v liniích C a D totiž tvořily bičíkovce kromě typového izolátu pouze 4 izoláty z 20. Bičíkovci všech čtyř izolátů odpovídají původnímu popisu bičíkovců *P. lanterna* tvarem i přibližnou velikostí. Izolát STAN2 tvoří nejmenší a průměrně relativně nejširší buňky, zatímco buňky izolátu KIR jsou největší a nejsou vůči délce tak široké. Globule symbiontů bičíkovců všech izolátů je velikostně i tvarově srovnatelná a její velikost se pohybuje kolem 7 μm . Právě této globuli byla věnována největší pozornost. Některé buňky psalteriomonád byly v minulosti úspěšně obarveny protargolem, u druhu *P. lanterna* se o to ale zatím nikdo nepokoušel. Proto v rámci této práce byly buňky bičíkovců vizualizovány dvěma způsoby barvení protargolem. První způsob je určený pro barvení střevních bičíkovců, je ale časově náročný a výsledný počet kvalitně obarvených buněk je dosti variabilní. V takto obarvených buňkách jsou dobře vizualizována jádra, globule symbiontů a často i bičíky. Tvar samotné buňky ale není příliš realisticky vyobrazený, buňky jsou zakulacené,

pravděpodobně kvůli použité fixáži. Druhý způsob barvení je určený primárně pro nálevníky. Tento způsob je časově i technicky méně náročný než předchozí způsob a také nedochází k tak časté ztrátě buněk. Nevýhodou je, že je nutné manipulovat s jednotlivými buňkami, což u velkých buněk není problém, u buněk o menších velikostech, které bičíkovci obvykle mají, už tato metoda není tak snadná, a proto se pro bičíkovce nepoužívá. Bičíkovci druhu *P. lanterna* jsou v porovnání s ostatními bičíkovci čeledi Psalteriomonadidae větší a relativně dobře se s nimi manipuluje, jsou tedy pro tuto metodu vhodnější. Po fixaci formalínem a obarvení mají buňky o něco realističtější tvar než u předchozího způsobu barvení, zvýrazněná jádra, bičíky a některé buňky i globuli symbiontů, ta ale není tak výrazná jako u druhého způsobu barvení. Metoda určená primárně pro nálevníky nepřinesla vždy optimální výsledky, ale vzhledem ke své relativní manipulační a časové nenáročnosti rozhodně stojí za to, barvení opakovat a lépe přizpůsobit bičíkovcům.

5.3 Methanogenní symbionti psalteriomonád

Sekvenací genu pro 16S rRNA byli methanogenní symbionti druhů *Psalteriomonas lanterna*, *P. magna* a *Psalteriomonadidae* sp. 5 (izolát KAKADU) v našich kulturách určeni jako zástupci rodu *Methanoregula*. Rod *Methanoregula* patří v rámci domény Archaea do kmene Halobacterota zatímco druh *Methanobacterium formicicum*, který byl určen při prvním popisu psalteriomonády druhu *P. lanterna*, se řadí do kmene Euryarchaeota (Broers et al., 1990; Lyu et al., 2018). V rámci rodu *Methanobacterium* bylo dosud popsáno kolem 25 druhů, kromě výše zmíněného druhu *M. formicicum* jsou to například druhy *M. alcaliphilum* a *M. palustre* (Worakit, 1986; Zellner et al., 1988). Při originálním popisu druhu *Psalteriomonas lanterna* byli jeho symbionti určeni na základě morfologické podobnosti a podobnosti biochemických a fyziologických vlastností s již popsanými symbionty dalších protist, jako je například *Urostomides striatus*, *Heterometopus palaeformis*, *Mastigella* sp. nebo *Pelomyxa palustris* a symbionty byli právě zástupci rodu *Methanobacterium* (van Bruggen et al., 1984, 1985, 1988; Embley et al., 1992b). Později Broers et al. (1992) symbionty druhu *Psalteriomonas lanterna* izolovali a studovali jejich fyziologické a biochemické vlastnosti. Kolonie symbiontů rostla na agarové misce za přítomnosti vodíku, oxidu uhličitého a kyseliny mravenčí. Naopak žádný růst nebyl pozorován při kultivaci s kyselinou octovou, methanolem,

methylaminem, glukózou ani s pyruvátém. Kultura nejlépe rostla při teplotě 37 °C a buňky v ní obsažené byly štíhlé nepohyblivé a měly tyčovitý tvar o velikosti 2–6x0,4 μm. Tyto vlastnosti sice korespondují s rodem *Methanobacterium*, ale zároveň i s dalšími zástupci methanogenních archaea. Kromě charakteristiky popsané u symbiontů druhu *P. lanterna* mívají buňky zástupců rodu *Methanobacterium* i tvar zahnutých tyček a šířku nejčastěji v rozmezí 0,5–1 μm (Boone, 2015). Rod *Methanoregula* byl popsán až o téměř 20 let později a dosud byly formálně popsány dva druhy *M. boonei* a *M. formicica* (Bräuer et al., 2011; Yashiro et al., 2011). Oba druhy využívají v methanogenezi vodík a oxid uhličitý, stejně jako zástupci rodu *Methanobacterium*, druh *M. formicica* využívá navíc i kyselinu mravenčí. Pro svůj růst využívají i kyselinu octovou. Optimum růstu pro druh *M. boonei* je 36 °C a pro *M. formicica* 31 °C. Oba druhy vytvářejí tenké tyčovité buňky a velikostně jsou menší než *Methanobacterium* s šířkou kolem 0,2–0,5 μm (Zinder & Bräuer, 2016), jsou tedy šířkou podobnější symbiontům psalteriomonád popsaných Broers et al. (1990) než zástupci rodu *Methanobacterium*, což odpovídá výsledkům získaným v rámci této práce.

Zástupci vodík využívajících methanogenních archaea sdílejí podobné nároky na podmínky prostředí a také mají velmi podobnou vnější morfologii, je tak těžké je pouze na základě těchto charakteristik správně určit. Vzhledem k tomu, jak si mohou být někteří methanogeni podobní a tomu, že rod *Methanoregula* byl popsán mnohem později než *Psalteriomonas lanterna* a *P. vulgaris*, je možné, při prvním popisu symbiontů psalteriomonád došlo k jejich nesprávné identifikaci. Také je ale možné, že primery, které byly v této práci pro sekvenaci symbiontů psalteriomonád použity nasedají přednostně na sekvence druhů rodu *Methanoregula*, které mohou pocházet například z potravních vakuol, a ne z globule symbiontů. Nepublikovaná data kolegů, kteří pracují s methanogenními symbionty nálevníků však potvrzují vhodnost primerů i pro rod *Methanobacterium* (D. Méndez-Sánchez, ústní sdělení), takže pravděpodobně nedošlo k jejich nesprávné identifikaci. Další možností je, že se u různých linií psalteriomonád vyskytují odlišní symbionti, jako je tomu například v různých populacích archaméby druhu *Pelomyxa palustris* se symbionty rodu *Methanosaeta* a *Methanobacterium* (van Bruggen et al., 1988; Gutiérrez et al., 2017) nebo u nálevníka druhu *Metopus contortus* se symbionty rodu *Methanoplanus* a *Methanocorpusculum* (van Bruggen et al., 1986; Embeley et al., 1992a). To je ale na základě našich výsledků nepravděpodobné, protože identifikace symbiontů probíhala z většího množství různě dlouho kultivovaných izolátů

a symbionti stejného rodu se vyskytují i u zástupců *Psalteriomonas magna*, a druhů Psalteriomonadidae sp. 5 a 17.

U žádného dalšího ze zkoumaných zástupců psalteriomonád rodů *Sawyeria* a *Harpagon* nebyli žádní methanogeni pozorováni – ani pod UV světlem ani jejich sekvenací. Z fylogenetického stromu psalteriomonád linie *Psalteriomonas/Sawyeria* a přítomnosti symbiontů stejného rodu *Methanoregula* se tak zdá, že k pohlcení methanogena došlo jednou u předka linie *Psalteriomonas/Sawyeria* a rodu *Sawyeria* došlo k jeho sekundární ztrátě. Sekundární ztráta symbiontů u druhu *S. marylandensis* pak mohla vést ke zvětšení aktivního povrchu hydrogenozomů a vzniku jejich nezvyklého miskovitého tvar (Barberà et al., 2010).

Symbionti psalteriomonád, u kterých byla určena sekvence části genu pro 16S rRNA, vytvářejí v rámci fylogenetického stromu dva větší klastry. Kromě dat získaných pro tuto práci z psalteriomonád byl rod *Methanoregula* jako endosymbiont zaznamenán i u anaerobních nálevníků rodů *Metopus*, *Brachonella* (Metopida), *Caenomorpha* (Armophorida), *Plagiopyla* (Plagiopylida) a zatím neurčeného zástupce podtřídy Scuticociliata (viz Rotterová et al., 2022). Sekvence většiny z nich (až na skupinu Scuticociliata) ale nejsou součástí zde provedené fylogenetické analýzy, protože zde byla osekvenována jiná část genu pro 16S rRNA. Zajímavé je, že rod *Methanoregula* dosud nebyl jako symbiont zaznamenán u archaméb, které jako jediní kromě výše uvedených skupin obsahují methanogenní symbionty, a to methanogeny z různých skupin – druh *Methanobacterium formicicum* nebo zástupce rodu *Methanosaeta* (van Bruggen et al., 1985, 1988; Gutiérrez et al., 2017).

Kromě sekvencí symbiotických buněk ze známých hostitelů se do rodu *Methanoregula*, a někdy do těsné blízkosti sekvencí ze symbiontů, umístilo velké množství environmentálních sekvencí. Environmentální sekvence nejsou nijak blíže specifikované, což znesnadňuje interpretaci celého rodu. Není tak jasné, jestli pocházejí z volně žijících organismů nebo zda by mohly také pocházet ze symbiontů psalteriomonád nebo jiných anaerobních protist, což je vzhledem k jejich vzájemné příbuznosti a umístění v rámci celého rodu pravděpodobné. Pokud by tomu tak bylo, mohlo by to znamenat, že celý rod *Methanoregula* je primárně endobiotický, ale je možné alespoň některé jeho zástupce kultivovat i mimo hostitelské buňky.

Mezi hostiteli a symbionty u psalteriomonád je patrná určitá specifita, ve které diverzita jednotlivých genetických linií v rámci druhů hostitelů odpovídá genetické diverzitě symbiontů. Podle unikátnosti sekvencí se hostitelé rozdělují na 15 skupin

a symbionti se dělí na 10 skupin. Šest genotypických skupin hostitelů obsahuje symbionty, kteří jsou pro ně specifictí a nebyly pozorováni u žádných jiných organismů. Čtyři genotypy představující genetické linie A a B druhu *Psalteriomonas lanterna* sdílejí symbionta o stejném genotypu, a to i přesto, že jsou si geneticky relativně vzdálené. Geneticky diverzifikovanou linii C představuje pět unikátních genotypů. Hostitelé čtyř z těchto genotypů sdílejí stejného symbionta a jeden má odlišného symbionta. Jediný genotyp představující celou genetickou linii D druhu *Psalteriomonas lanterna* obsahuje symbionty ze dvou genotypových skupin symbiontů, ty jsou si ale velmi blízce příbuzné. Pro jasnější zobrazení specifity je ale třeba získat sekvence z většího množství izolátů a také získat delší úseky genu pro 16S rRNA.

6. Shrnutí

V rámci této práce bylo osekvenováno 37 nových izolátů představující sladkovodní zástupce čeledi Psalteriomonadidae. Po proběhlé fylogenetické analýze se všechny nové izoláty umístily mezi známe linie psalteriomonád. 16 z izolátů se zařadilo do line *Psalteriomonas/Sawyeria*. 21 z izolátů se v přiřadilo do rodu *Harpagon* v rámci linie *Harpagon/Monopylocystis*. Dva z nových izolátů pravděpodobně představují nové druhy zde označené jako Psalteriomonadidae sp. 16 a 17 spadající do line *Psalteriomonas/Sawyeria*. V rámci této práce byla největší pozornost věnována druhu *Psalteriomonas lanterna*, do něhož bylo přidáno sedm nových izolátů. Na základě genetické variability byl celý druh rozdělen do čtyř linií A-D. Pro porovnání jednotlivých linií byla dokumentována morfologie měňavek z linie A, B a D. Rozdíly v morfologii zástupců jednotlivých linií byly pouze nepatrné (např. poměr délky a šířky buňky nebo velikost globule symbiontů). Ve čtyřech z 18 celkových studovaných izolátů druhu *P. lanterna* se vyskytovala forma bičíkovce, která byla v minulosti dokumentována pouze u jednoho izolátu. U všech izolátů s bičíkatou formou byla dokumentována morfologie a byly připraveny trvalé preparáty pomocí dvou způsobů barvení protargolem.

Methanogenní symbionti byli identifikováni na základě autofluorescence u všech studovaných izolátů druhů *Psalteriomonas lanterna* a *P. magna* a u jednoho izolátu druhu Psalteriomonadidae sp. 5. Všichni symbionti byli určeni jako druh methanogenních archaea rodu *Methanoregula*. U žádného jiného ze studovaných izolátů čeledi Psalteriomonadidae, zejména rodů *Sawyeria* a *Harpagon*, nebyli methanogenní symbionti zaznamenáni. Celkem bylo získáno 22 sekvencí symbiontů psalteriomonád a na sestaveném fylogenetickém stromu genu pro 16S rRNA, se všechny sekvence izolátů rozdělují do dvou velkých klastrů. Na základě unikátnosti byly sekvence symbiontů rozděleny na 10 genotypů. Pro zjištění hostitelské specifity byl fylogenetický strom genotypů symbiontů srovnán s fylogenetickým stromem ze sekvencí jejich hostitelů.

7. Literatura

- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., ... Zhang, Q. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4–119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
- Barber, R. D. (2016). Methanogenesis: Ecology. *ELS*, April, 1–9. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000475.pub3>
- Barberà, M. J., Ruiz-Trillo, I., Tufts, J. Y. A., Bery, A., Silberman, J. D., & Roger, A. J. (2010). *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) has a hydrogenosome with novel metabolic properties. *Eukaryotic Cell*, 9(12), 1913–1924. <https://doi.org/10.1128/EC.00122-10>
- Blaut, M. (1994). Metabolism of methanogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66(1–3), 187–208. <https://doi.org/10.1007/BF00871639>
- Boone, D. R. (2015). *Methanobacterium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00495>
- Bräuer, S. L., Cadillo-Quiroz, H., Ward, R. J., Yavitt, J. B., & Zinder, S. H. (2011). *Methanoregula boonei* gen. nov., sp. nov., an acidiphilic methanogen isolated from an acidic peat bog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), 45–52. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.021782-0>
- 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(1), 98–105. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80302-0](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80302-0)
- Broers, C. A. M., Stumm, C. K., & Vogels, G. D. (1992). Monoxenic cultivation of the anaerobic amoeboflagellate *Psalteriomonas lanterna* and isolation of the methanogenic endosymbiont. *FEMS Microbiology Letters*, 92(1), 115–118. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90551-X](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90551-X)
- Broers, C. A. M., Stumm, C. K., Vogels, G. D., & Brugerolle, G. (1990). *Psalteriomonas lanterna* gen. nov., sp. nov., a free-living amoeboflagellate isolated from freshwater anaerobic sediments. *European Journal of Protistology*, 25(4), 369–380. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80130-6](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80130-6)
- Brown, M. W., Silberman, J. D., & Spiegel, F. W. (2010). A morphologically simple species of *Acrasis* (Heterolobosea, Excavata), *Acrasis helenhemmesae* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(4), 346–353. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2010.00481.x>
- Brugerolle, G., & Simpson, A. G. B. (2004). The flagellar apparatus of heteroloboseans. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(1), 96–107. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00169.x>

- Buan, N. R. (2018). Methanogens: Pushing the boundaries of biology. *Emerging Topics in Life Sciences*, 2(4), 629–646. <https://doi.org/10.1042/ETLS20180031>
- Carter, R. F. (1970). Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *The Journal of Pathology*, 100(4), 217–244. <https://doi.org/10.1002/path.1711000402>
- Cavalier-Smith, T., & Nikolaev, S. (2008). The zooflagellates *Stephanopogon* and *Percolomonas* are a clade (class percolatea: Phylum percolozoa). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(6), 501–509. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00356.x>
- Clarke, K. J., Finlay, B. J., Esteban, G., Guhl, B. E., & Embley, T. M. (1993). *Cyclidium porcatum* n. sp.: a Free-living anaerobic scuticociliate containing a stable complex of hydrogenosomes, eubacteria and archaeobacteria. *European Journal of Protistology*, 29(2), 262–270. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80281-6](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80281-6)
- De Graaf, R. M., Duarte, I., Van Alen, T. A., Kuiper, J. W., Schotanus, K., Rosenberg, J., Huynen, M. A., & Hackstein, J. H. (2009). The hydrogenosomes of *Psalteriomonas lanterna*. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-287>
- Doddema, H. J., & Vogels, G. D. (1978). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(5), 752–754. <https://doi.org/10.1128/aem.36.5.752-754.1978>
- 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(5), 399–410. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040362>
- Embley, T. M., Finlay, B. J., & Brown, S. (1992a). RNA sequence analysis shows that the symbionts in the ciliate *Metopus contortus* are polymorphs of a single methanogen species. *FEMS Microbiology Letters*, 97(1–2), 57–61. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90363-S](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90363-S)
- Embley, T. M., Finlay, B. J., Thomas, R. H., & Dyal, P. L. (1992b). The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. *Journal of General Microbiology*, 138(7), 1479–1487. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-7-1479>
- Embley, T. Martin, & Finlay, B. J. (1993). Systematic and morphological diversity of endosymbiotic methanogens in anaerobic ciliates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(3–4), 261–271. <https://doi.org/10.1007/BF00873086>
- Fenchel, T., & Finlay, B. J. (2010). Free-living protozoa with endosymbiotic methanogens. In: Hackstein, J. (Endo)symbiotic Methanogenic Archaea. *Microbiology Monographs*, vol 19. Springer, Berlin, Heidelberg. 1–11 https://doi.org/10.1007/978-3-642-13615-3_1

- Fox, G. E., Magrum, L. J., & Balch, W. E. (1977). Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(10), 4537–4541. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4537>
- Gutiérrez, G., Chistyakova, L. V., Villalobo, E., Kostygov, A. Y., & Frolov, A. O. (2017). Identification of *Pelomyxa palustris* endosymbionts. *Protist*, 168(4), 408–424. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2017.06.001>
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symp*, 41, 95–98.
- Hanousková, P., Táborský, P., & Čepička, I. (2019). *Dactylomonas* gen. nov., a novel lineage of heterolobosean flagellates with unique ultrastructure, closely related to the amoeba *Selenaion koniopes* Park, De Jonckheere & Simpson, 2012. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 120–139. <https://doi.org/10.1111/jeu.12637>
- Harding, T., Brown, M. W., Plotnikov, A., Selivanova, E., Park, J. S., Gunderson, J. H., Baumgartner, M., Silberman, J. D., Roger, A. J., & Simpson, A. G. B. (2013). Amoeba stages in the deepest branching heteroloboseans, including *Pharyngomonas*: Evolutionary and systematic implications. *Protist*, 164(2), 272–286. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2012.08.002>
- Hendrickson, E. L., & Leigh, J. A. (2008). Roles of coenzyme F420-reducing hydrogenases and hydrogen- and F420-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenases in reduction of F420 and production of hydrogen during methanogenesis. *Journal of Bacteriology*, 190(14), 4818–4821. <https://doi.org/10.1128/JB.00255-08>
- Hirakata, Y., Oshiki, M., Kuroda, K., Hatamoto, M., Kubota, K., Yamaguchi, T., Harada, H., & Araki, N. (2015). Identification and detection of prokaryotic symbionts in the ciliate *Metopus* from anaerobic granular sludge. *Microbes and Environments*, 30(4), 335–338. <https://doi.org/10.1264/jisme2.ME15154>
- Nikolaev, S. I., Mylnikov, A. P., Berney, C., Fahrni, J., Pawlowski, J., Aleshin, V. V., and Petrov, N. B. (2004). Molecular phylogenetic analysis places *Percolomonas cosmopolitus* within Heterolobosea: Evolutionary implications. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(5), 575–581. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00294.x>
- Karl, D. M., Beversdorf, L., Björkman, K. M., Church, M. J., Martinez, A., & Delong, E. F. (2008). Aerobic production of methane in the sea. *Nature Geoscience*, 1(7), 473–478. <https://doi.org/10.1038/ngeo234>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kelly, C. J. O., Silberman, J. D., Amaral, L. A., Nerad, T. A., & Sogin, M. L. (2003). Amoebae from anoxic environments. *Protist*, 154(July), 281–290.

- Kirschke, S., Bousquet, P., Ciais, P., Saunoy, M., Canadell, J. G., Dlugokencky, E. J., Bergamaschi, P., Bergmann, D., Blake, D. R., Bruhwiler, L., Cameron-Smith, P., Castaldi, S., Chevallier, F., Feng, L., Fraser, A., Heimann, M., Hodson, E. L., Houweling, S., Josse, B., ... Zeng, G. (2013). Three decades of global methane sources and sinks. *Nature Geoscience*, 6(10), 813–823. <https://doi.org/10.1038/ngeo1955>
- Kubo, K., Lloyd, K. G., F Biddle, J., Amann, R., Teske, A., & Knittel, K. (2012). Archaea of the miscellaneous crenarchaeotal group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. *ISME Journal*, 6(10), 1949–1965. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.37>
- Lee, J. H. (2010). De novo formation of basal bodies during cellular differentiation of *Naegleria gruberi*: Progress and hypotheses. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21(2), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.009>
- Lee, W. J., Miller, K., & Simpson, A. G. B. (2014). Morphological and molecular characterization of a new species of *Stephanopogon*, *Stephanopogon pattersoni* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61(4), 389–398. <https://doi.org/10.1111/jeu.12124>
- Lewis, W. H., Sendra, K. M., Embley, T. M., & Esteban, G. F. (2018). Morphology and phylogeny of a new species of anaerobic ciliate, *Trimyema finlayi* n. sp., with endosymbiotic methanogens. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00140>
- Lindmark, D. G., & Muller, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 248(22), 7724–7728. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)43249-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)43249-3)
- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(April), 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., & Whitman, W. B. (2018). Methanogenesis. *Current Biology*, 28(13), R727–R732. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>
- McInerney, M. J., Sieber, J. R., & Gunsalus, R. P. (2009). Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 623–632. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.001>
- Mink, R. W., & Dugan, P. R. (1977). Tentative identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(3), 713–717. <https://doi.org/10.1128/aem.33.3.713-717.1977>
- Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*, 139(12), 2879–2889. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-12-2879>
- Narayanan, N., Krishnakumar, B., Anupama, V. N., & Manilal, V. B. (2009). *Methanosaeta* sp., the major archaeal endosymbiont of *Metopus es*. *Research in Microbiology*, 160(8), 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.07.011>

- Nie, D. (1950). Morphology and taxonomy of the intestinal protozoa of the guinea-pig *Cavia porcella*. *Journal of Morphology*, 86(3), 381–494. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050860302>
- Page, F. C. (1967). Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *The Journal of Protozoology*, 14(3), 499–521. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1967.tb02036.x>
- Pánek, T. and Čepička, I. (2012). Diversity of Heterolobosea. In: *Genetic Diversity in Microorganisms*. <https://doi.org/10.5772/35333>
- 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(PART 7), 2280–2304. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.063487-0>
- 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(4), 542–567. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2014.05.005>
- Pánek T., Simpson A.G.B., Brown M.W., Dexter Dyer B. (2016) Heterolobosea. In: Archibald J. et al., *Handbook of the protists*, Springer, 1005–1046. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_10-1
- Park, J. S., De Jonckheere, J. F., & Simpson, A. G. B. (2012). Characterization of *Selenaion koniopes* n. gen., n. sp., an amoeba that represents a new major lineage within heterolobosea, isolated from the Wieliczka salt mine. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(6), 601–613. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00641.x>
- Park, J. S., & Simpson, A. G. B. (2016). Characterization of a deep-branching heterolobosean, *Pharyngomonas turkanaensis* n. sp., isolated from a non-hypersaline habitat, and ultrastructural comparison of cysts and amoebae among *Pharyngomonas* strains. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(1), 100–111. <https://doi.org/10.1111/jeu.12260>
- Rother, M., & Metcalf, W. W. (2004). Anaerobic growth of *Methanosarcina acetivorans* C2A on carbon monoxide: An unusual way of life for a methanogenic archaeon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(48), 16929–16934. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407486101>
- Rotterová, J., Edgcomb, V. P., Čepička, I., & Beinart, R. (2022). Anaerobic ciliates as a model group for studying symbioses in oxygen-depleted environments. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 0–2. <https://doi.org/10.1111/jeu.12912>
- Smirnov, A. V., & Fenchel, T. (1996). *Vahlkampfia anaerobica* n. sp. and *Vannella peregrinia* n. sp. (Rhizopoda) anaerobic amoebae from a marine sediment. *Archiv Fur Protistenkunde*, 147(2), 189–198. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(96\)80033-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(96)80033-9)
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688–2690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>

- Swofford, D.. (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b10. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts. 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00191.x.
- Takeshita, K., Yamada, T., Kawahara, Y., Narihiro, T., Ito, M., & Kamagata, Y. (2019). Tripartite symbiosis of an anaerobic Scuticociliate with two hydrogenosome-associated endosymbionts, a *Holospora*-related alphaproteobacterium and a methanogenic archaeon. *Applied and Environmental Microbiology* 85(24) 7, 1–14.
- Uhrová, K. (2017). Diverzita nekultivovatelných a obtížně kultivovatelných zástupců čeledi Psalteriomonadidae (Excavata: Heterolobosea). Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie. Vedoucí práce Čepička, Ivan.
- van Bruggen, J. J. A., van Rens, G. L. M., Geertman, E. J. M., Zwart, K. B., Stumm, C. K., and Vogels, G. D. (1988). Isolation of a methanogenic endosymbiont of the sapropelic amoeba *Pelomyxa palustris*. *The Journal of Protozoology*, 35(1), 20–23. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1988.tb04068.x>
- van Bruggen, J. J.A., Zwart, K. B., Hermans, J. G. F., van Hove, E. M., Stumm, C. K., & Vogels, G. D. (1986). Isolation and characterization of *Methanoplanus endosymbiosus* sp. nov., an endosymbiont of the marine sapropelic ciliate *Metopus contortus* quennerstedt. *Archives of Microbiology*, 144(4), 367–374. <https://doi.org/10.1007/BF00409886>
- van Bruggen, J. J. A., Stumm, C. K., & Vogels, G. D. (1983). Symbiosis of methanogenic bacteria and sapropelic protozoa. *Archives of Microbiology*, 136(2), 89–95. <https://doi.org/10.1007/BF00404779>
- van Bruggen, J. J. A., Zwart, K. B., Stumm, C. K., & Vogels, G. D. (1984). *Methanobacterium formicicum*, an endosymbiont of the anaerobic ciliate *Metopus striatus* McMurrich. *Microbiology* 9. 1–7.
- van Bruggen, J. J.A., Stumm, C. K., Zwart, K. B., & Vogels, G. D. (1985). Endosymbiotic methanogenic bacteria of the sapropelic amoeba *Mastigella*. *FEMS Microbiology Letters*, 31(3), 187–192. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(85\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0378-1097(85)90020-5)
- van Hoek, A. H. A. M., Van Alen, T. A., Sprakel, V. S. I., Leunissen, J. A. M., Brigge, T., Vogels, G. D., & Hackstein, J. H. P. (2000). Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates. *Molecular Biology and Evolution*, 17(2), 251–258. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026304>
- Woese, C. R., Magrum, L. J., & Fox, G. E. (1978). Archaeobacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 11(3), 245–252. <https://doi.org/10.1007/BF01734485>
- Wolfe, R. S., & McBride, B. C. (1971). A new coenzyme of methyl transfer, coenzyme M. *Biochemistry*, 10(12), 2317–2324. <https://doi.org/10.1021/bi00788a022>
- Worakit, S., Boone, D. R., Mah, R. A., Abdel-Samie, M. and El-Halwagi, M. M. (1986). *Methanobacterium alcaliphilum* sp. nov. an H₂-utilizing methanogen that grows at high pH values. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36(3), 380–382. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-3-380>

- Yamada, K., Kamagata, Y., & Nakamura, K. (1997). The effect of endosymbiotic methanogens on the growth and metabolic profile of the anaerobic free-living ciliate *Trimyema compressum*. *FEMS Microbiology Letters*, 149(1), 129–132. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00068-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00068-2)
- Yashiro, Y., Sakai, S., Ehara, M., Miyazaki, M., Yamaguchi, T., & Imachi, H. (2011). *Methanoregula formicica* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(1), 53–59. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014811-0>
- Zellner, G., Bleicher, K., Braun, E., Kneifel, H., Tindall, B. J., de Macario, E. C., & Winter, J. (1988). Characterization of a new mesophilic, secondary alcohol-utilizing methanogen, *Methanobacterium palustre* spec. nov. from a peat bog. *Archives of Microbiology*, 151(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/BF004444660>
- Zinder, S., & Bräuer, S. (2016). *Methanoregula*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01368>