

Algivorous Freshwater Protists of the Phylum Cercozoa (Rhizaria)

–

Structure, Life Histories and Evolution

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

SEBASTIAN HESS

aus Engelskirchen

2015

Berichterstatter: **Prof. Dr. Michael Melkonian**
Prof. Dr. Hartmut Arndt

Tag der Disputation: **02. Juli 2014**

Abstract

In freshwater ecosystems exist various elusive protists that consume microalgae in a selective and specialised manner. Some of these ‘parasitoid’ micro-organisms have been known since the mid of the 19th century and were studied by several naturalists. However, difficulties in long-term maintenance and the convoluted taxonomic history of such forms strongly impeded further research. The present knowledge about protistan parasitoids of freshwater algae, in particular concerning phylogenetic affiliations, is extremely poor. During the present studies, amoeboid and flagellate protists feeding on zygnematophycean and chlorophycean green algae (Viridiplantae) have been isolated from natural freshwater samples and resulted in eighteen single-cell derived cultures. Based on culture material, cell morphology, feeding processes, locomotory behaviour and life histories have been studied by means of light microscopy and time-lapse photography. Feeding experiments were conducted to reveal the food range specificity and SSU rDNA sequences of the strains were subjected to molecular phylogenetic analyses to allocate the organisms of interest in the tree of life.

Eight strains of naked, filose amoebae could be morphologically assigned to the species *Vampyrella lateritia* (FRESENIUS, 1856) LEIDY, 1879, *Vampyrella pendula* CIENKOWSKI, 1865 and *Leptophrys vorax* (CIENKOWSKI, 1865) ZOPF, 1885, traditionally included in the family Vampyrellidae sensu ZOPF 1885. The remaining strains represented naked, gliding nanoflagellates of unknown identity. Both groups contained representatives that perforate algal cells and feed on the cell contents by means of phagocytosis. Molecular phylogenetic analyses revealed that the algivorous vampyrellid amoebae and the nanoflagellates belong to two separate lineages within the phylum Cercozoa (Rhizaria), located in the subphylum Endomyxa and Filosa, respectively. The phylogenies reflected the phenotypic differences between the genera *Vampyrella* and *Leptophrys*, which formed two distantly related lineages within a largely uncharacterised vampyrellid clade, and allowed a phylogenetic definition of the genera and two corresponding families, Vampyrellidae ZOPF, 1885 and Leptophryidae HESS et al., 2012. The algivorous nanoflagellates turned out to belong to ‘clade X’ within the order Glissomonadida, in which they constitute two discrete lineages among environmental sequences. Members of one lineage invade cells of a relatively small spectrum of live zygnematophycean algae, thus displaying parasitoid characteristics, whereas representatives of the other lineage extract cell contents from a much broader range of dead algae, acting as ‘microbial scavengers’. Together with clear differences in cell morphology and locomotory behaviour these findings led to the establishment of the genera *Viridiraptor* and *Orciraptor*, and a novel and distinct glissomonad family, the Viridiraptoridae HESS ET MELKONIAN, 2013, formerly known as ‘clade X’.

Data on cell architecture, feeding stages, the flagellar transitional region and the basal apparatus of *Viridiraptor invadens*, obtained by electron microscopy, resulted in the ultrastructural characterisation of the Viridiraptoridae. A ‘distal dense plate/collar complex’ in the flagellar transitional region, the arrangement of basal bodies and the microtubular flagellar roots, in particular, supported the affiliation of viridiraptorids to the glissomonad Cercozoa. The discovery of an acorn/V-shaped filament system at the proximal end of the flagellar transitional region in *Viridiraptor invadens* allowed introduction of a numbering system for basal body triplets of flagellate Cercozoa. Electron microscopy, furthermore, revealed the

ultrastructure of the ‘reticulocyst’, a novel, extracellular layer formed by *Viridiraptor invadens* prior to cell wall perforation. This extrusome-derived, durable cell coat displays a mesh-like structure and is firmly attached to the algal cell wall, covering the invasion hole. Based on these data and light microscopical observations of live cells, hypotheses on reticulocyst function during the invasion and feeding process of *Viridiraptor invadens* are presented.

The phenotypic and phylogenetic information about the algivorous protists investigated, resulted in a comprehensive characterisation of vampyrellid representatives and novel algivorous nanoflagellates, the viridiraptorids. Based on a critical evaluation of the relevant taxonomic literature, first steps towards a phylogeny-based and reliable taxonomy of these organisms were made. Finally, this thesis provides an evaluation of the methods used and a discussion about ecological aspects of algivorous protists, especially ‘protoplast feeders’, in freshwater ecosystems.

Kurzzusammenfassung

In Süßwasser-Ökosystemen existiert eine Vielzahl unscheinbarer Protisten, die Mikroalgen auf eine selektive und sehr spezialisierte Weise konsumieren. Manche dieser "parasitoiden" Formen wurden bereits im 19. Jahrhundert entdeckt und von einigen Naturforschern studiert. Die schwierige Kultivierung und eine verwirrende taxonomische Historie dieser Organismen haben weiterführende Forschungen allerdings sehr erschwert. Der derzeitige Kenntnisstand über einzellige Parasitoide von Süßwasser-algen ist daher sehr fragmentarisch, insbesondere in Bezug auf die phylogenetische Einordnung vieler Vertreter. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden amöboide und begeißelte Protisten, die Grünalgen (Chlorophyceae und Zygnematophyceae) befallen, aus Süßwasserproben isoliert. Auf der Basis von 18 klonalen (aus Einzelzellen hervorgegangenen) Kulturen wurden diese Organismen mittels konventioneller Lichtmikroskopie sowie Zeitraffer-Fotografie hinsichtlich Zellmorphologie, Nahrungsaufnahme, Bewegungsverhalten und Lebensweise untersucht. Durch Fütterungsexperimente wurden Nahrungspräferenzen der Stämme ermittelt und phylogenetische Analysen des SSU rDNA-Gens ermöglichten eine Einordnung der Organismen im Stammbaum des Lebens.

Acht Isolate nackter, filoser Amöben konnten morphologisch den Arten *Vampyrella lateritia* (FRESENIUS, 1856) LEIDY, 1879, *Vampyrella pendula* CIENKOWSKI, 1865 und *Leptophrys vorax* (CIENKOWSKI, 1865) ZOPF, 1885 zugeordnet werden, welche traditionell zu den sogenannten Vampiramöben (Familie Vampyrellidae sensu ZOPF 1885) zählen. Die übrigen Stämme stellten hingegen nackte, gleitende Nanoflagellaten mit unbekannter Identität dar. Beide Gruppen enthielten Vertreter, die Algenzellen perforieren und sich durch Phagozytose von deren Inhalt ernähren. Die phylogenetischen Analysen zeigten, dass die algivoren Vampiramöben und die Nanoflagellaten zwei unterschiedlichen Untergruppen des Stammes Cercozoa (Rhizaria) angehören: Endomyxa und Filosa. Des Weiteren spiegelten die Stammbaumhypothesen der vampyrelliden Amöben die phänotypischen Unterschiede zwischen den Gattungen *Vampyrella* und *Leptophrys* wider. Beide Gattungen stellten zwei separate Linien innerhalb eines größtenteils uncharakterisierten Vampiramöben-Klados dar, welcher der Ordnung Vampyrellida WEST, 1901 gleichgesetzt wurde. Darüber hinaus ermöglichten diese Ergebnisse erstmals eine phylogenetische Definition der Gattungen *Vampyrella* und *Leptophrys* sowie der Familien Vampyrellidae ZOPF, 1885 und Leptophryidae HESS et al., 2012.

Die algivoren Nanoflagellaten gehören zu der Ordnung Glissomonadida und fallen in einen bislang uncharakterisierten Klados aus Umweltsequenzen ("Clade X"). In diesem teilen sich die untersuchten Stämme auf zwei diskrete Linien auf. Mitglieder der einen Linie dringen in lebendige Zellen einiger Zygnematophyteen ein und besitzen somit parasitoide Eigenschaften. Vertreter der anderen Linie phagozytieren den Zellinhalt von einem vergleichsweise großen Spektrum toter Algenzellen (Zygnematophyceae, Chlorophyceae) und agieren somit als "mikrobielle Aasfresser". Diese Befunde haben zusammen mit deutlichen Unterschieden in Zellmorphologie und Bewegungsverhalten zur Etablierung der Gattungen *Viridiraptor* und *Orciraptor* sowie der neuen und phänotypisch recht eigenartigen Familie Viridiraptoridae HESS et MELKONIAN, 2013 (früher "Clade X") innerhalb der Glissomonadida geführt.

Mittels Elektronenmikroskopie wurden die Zellarchitektur, die Übergangsregion der Geißel sowie der Basalapparat von *Viridiraptor invadens* ultrastrukturell untersucht. Insbesondere ein Komplex aus einer transversen Platte und einem elektronendichten Kragen in der Übergangsregion der Geißel, die Anordnung der Basalkörper und die mikrotubulären Geißelwurzeln unterstützen die Verwandtschaft der Viridiraptoridae zu den übrigen Glissomonadida. Die Entdeckung des sogenannten "acorn/V-shaped filament systems" am proximalen Ende der Geißel-Übergangsregion von *Viridiraptor invadens* ermöglichte die Einführung eines Systems für die Nummerierung von Basalkörper-Triplets. Darüber hinaus deckte die Elektronenmikroskopie die Ultrastruktur der sogenannten "Retikulozyste" auf. Diese neuartige, extrazelluläre Schicht wird von *Viridiraptor invadens* vor der Perforation der Algenzellwand sehr wahrscheinlich aus dem Inhalt von Extrusomen gebildet. Die Retikulozyste stellt eine langlebige Zellhülle mit netzartiger Struktur dar. Sie ist fest in der Algenzellwand verankert und bedeckt die von *Viridiraptor invadens* gebildete Einstiegsöffnung. Die Ultrastrukturdaten führten zusammen mit Beobachtungen an lebenden Zellen zu Hypothesen über die Funktion der Retikulozyste während der Penetration der Algenzelle und der Nahrungsaufnahme von *Viridiraptor invadens*.

Das Resultat der phänotypischen und phylogenetischen Untersuchungen war eine detaillierte Charakterisierung von taxonomisch wichtigen Vertretern der Vampiramoeben sowie von neuartigen, algenfressenden Nanoflagellaten, den Viridiraptoridae. Durch die kritische Analyse taxonomisch relevanter Literatur konnten erste Schritte zu einer phylogeniebasierten Taxonomie dieser Organismen gemacht werden. Darüber hinaus enthält die vorliegende Arbeit eine Beurteilung der eingesetzten Methoden und eine Diskussion über ökologische Aspekte algivorer Protisten in Süßwasser-Ökosystemen, insbesondere von "Protoplastenfressern".