

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Zuzana Karpecká

Keratinózní struktury nahrazující zuby u obratlovců
Keratinized tooth replacing structures in vertebrates

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Robert Černý, PhD.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 17. 5. 2013

Podpis

Poděkování :

Díky, že trpělivost jste se mnou měli,
rodiče, známí, ale hlavně Vy, školiteli!

Také Vám chci zde poděkovat,
že ujal jste se práce mé,
a dokolečka opravoval,
co mě již přišlo ztracené...

Ostatním taky, však oni vědí,
kdo porůznu mi pomáhal.
Kdo článek, radu, odpovědi
mi na otázky vždycky dal.

Abstrakt

Ke ztrátě pravých, kalcifikovaných zubů, došlo několikrát nezávisle a napříč celým fylogenetickým stromem obratlovců. V této bakalářské práci jsem se zaměřila na popis keratinózních struktur, nahrazujících zuby, protože tyto se nachází u překvapivého množství obratlovců a ač evolučně vznikaly nezávisle, často projevují nápadné fenotypické podobnosti. Nejznámější je zajisté ptačí zobák, konkrétněji jeho keratinózní ramfotéka, která pokrývá i čelisti želv. Zvláštní skupinou obratlovců jsou bezčelistnaté mihule a sliznatky, u nichž jsou rohovinové zuby primárním znakem a jsou pravým, kalcifikovaným zubům, asi nejpodobnější. Keratinózní zoubky a povrchy čelistí jsou typické i pro ústní ústrojí žabích pulců. Zajímavostí je, že rohovinový povrch čelistí nemusí zuby kalcifikované pouze nahrazovat, ale může je i doplňovat – jak k tomu dochází hlavně u ryb. U jednoho nadřádu, *Ostariophysi*, kam patří i kaprovité ryby, které nemají orální dentici, došlo k vylepšení vlastností tohoto rohovinového povrchu přidáním jednobuněčných výběžků, tzv. unculi. Posledními zástupci s keratinózními strukturami nahrazujícími zuby jsou velryby, jejichž rohovinové kostice tvoří v ústech filtr na zachytávání potravy. Keratinózní struktury nahrazující zuby jsou velice diverzifikované, překvapivě málo prozkoumané a nabízejí unikátní možnost zkoumat paralelní evoluci fenotypově podobných struktur.

Klíčová slova: keratinózní struktury, keratin, zobák, rohovinový povrch čelistí, unculi

Abstract

The loss of genuine, calcification teeth happened several times independently throughout the phylogenetic tree of vertebrates. In this thesis, I focus on the description of horny structures replacing the true teeth. Despite occurring in non-related groups of animals, these structures have very similar shapes. The bird beak is well-known; mainly for the horny rhamphotheca that covers jaws of turtles, too. Jawless lampreys and hagfishes belong to a special group of vertebrates; their primary dentitions are horny teeth. This special type of teeth looks very similar to the calcification teeth of other vertebrates. Keratin teeth and jaw sheaths are typical for tadpoles, too. The horny jaw sheaths can even make a supplement to genuine teeth, as it is for example in case of fish. All superorder *Ostariophysi*, but mainly order *Cypriniformes* which lack oral dentitions, have this horny sheath supplemented by unculi. The last group of animals with keratinous structures in oral cavity are whales. This mammals use horny baleens as filter for krill. Keratin structures replacing genuine teeth have diverse forms, a few are explored and they provide the unique possibility to investigate parallel evolution of phenotypically similar structures.

Key words: horny structures, keratin, beak, horny jaw sheath, unculi

Obsah

1. Úvod - zuby a jejich keratinózní náhrady	1
2. Keratinózní ramfotéka zobáků	4
2.1. Stavba zobáků ptáků	4
2.1.1. Vnitřní zobák	4
2.1.2. Ramfotéka	6
2.1.3. Složená ramfotéka	7
2.2. Evoluce ztráty zubů u ptáků	8
2.2.1. Nahrazování zubů zobákem ve fosilním záznamu	9
2.3. Stavba zobáku u želv	9
2.4. Evoluce ztráty zubů u želv	10
3. Mihule	11
3.1. Vývoj a stavba rohovinových zubů	12
3.3. Vývoj a stavba keratinózních lamin	15
4. Sliznatky	17
4.1. Vývoj a stavba rohovinových zubů	17
4.2. Keratin zubů u sliznatky	18
5. Orální aparát žabích pulců	19
5.1. Stavba orálního aparátu pulců	19
5.1.1. Měkké tkáně	19
5.1.2. Labiální zuby	20
5.1.3. Rohovinový povrch čelistí	22
5.2. Evoluční význam pulčních rohovinových struktur	25
6. Ryby a jejich keratinózní struktury	26
6.1. Rohovinový povrch čelistí	26
6.2. Unculi	27
6.2.1. Keratin unculů	27
6.2.2. Výskyt unculů	28
7. Keratinózní kostice velryb	33
7.1. Stavba kostic	33
7.2. Evoluce kostic	35
8. Závěr	37
Zdroje	38

1. Úvod - zuby a jejich keratinózní náhrady

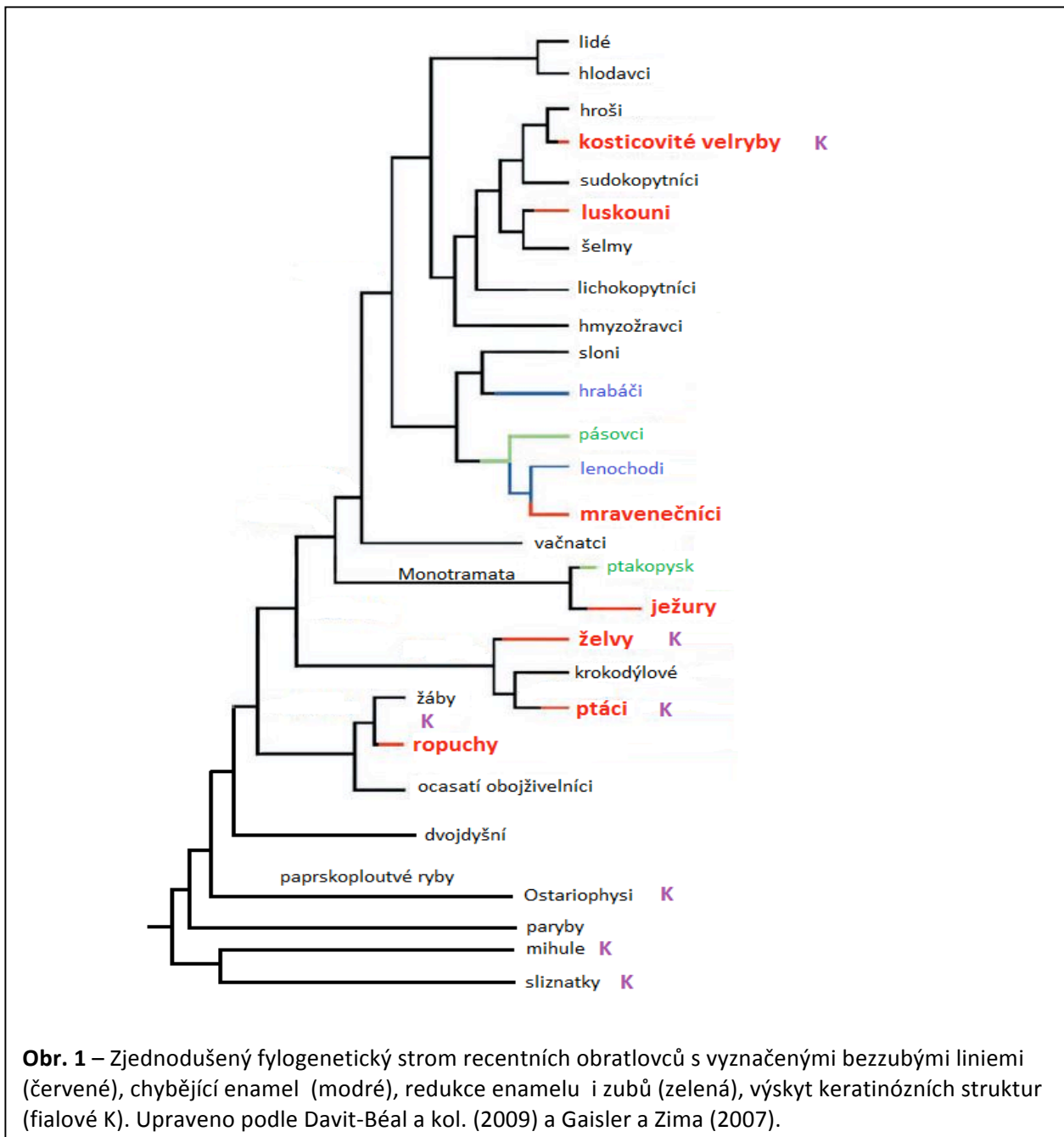
Kalcifikované zuby patří vedle chrupavky a kosti k nejstarším pevným tkáním v říši obratlovců. Zuby, jak je známe dnes, jsou na povrchu pokryty sklovinou (enamel) - nejtvrděší látkou vertebrálního těla. Sklovina je tvořena ameloblasty - buňkami epiteliálního původu, na rozdíl od vrstvy zuboviny (dentin), kterou produkují mezenchymatické odontoblasty. Vzhledem k vysokému stupni mineralizace obou tkání, enamelu i dentinu, jsou zuby a podobné struktury obsahující tyto proteiny, často nacházeny ve fosilním záznamu. Nejstaršími fosíliemi tohoto druhu jsou struktury ústního aparátu konodontů - malých, červovitých živočichů z přelomu kambria a ordoviku (zhruba 500 miliónu let př. n. l.) (Donoghue a Sansom, 2002).

Všechny povrchové struktury obratlovců se stavbou zubu se nazývají odontody (kupř. Huisseune a Sire, 1998; Sire a Huisseune, 2003; Fraser a kol., 2010). Podle výskytu odontod na těle živočicha se jim většinou říká buď zuby (nacházející se v orální i faryngeální dutině; srv. orální a faryngeální dentice), nebo dermální dentikly (tzv. extraorální zuby *sensu*, Huisseune a Sire, 1998), které jsou přítomné např. u recentních paryb v podobě plakoidních šupin. Splynutím původně jednotlivých odontod se pak mohou vytvářet odontokomplexy, které dávají vznik množství druhů šupin a plátů (Huisseune a Sire, 1998) – např. dermální pláty vyhynulých bezčelistnatých a čelistnatých pancířnatých ryb, ganoidní šupiny, apod.

Stejná anatomická stavba resp. podobnost plakoidních šupin a zubů recentních paryb vedla k vytvoření tzv. „outside in“ hypotézy o evolučním vzniku zubů (např. Huisseune a kol., 2009; Fraser a kol., 2010). Tato teorie vychází z předpokladu, že odontody, které se původně vyskytovaly na povrchu těla a tudíž jsou ektodermálního původu, se vznikající ústní dutinou praobratlovců vmigrovaly do této dutiny a postupně se integrovaly do čelistí, až následně vytvořily dentici. Naopak alternativní teorie (tzv. „inside out“) vysvětluje evoluci zubů tak, že původní zuby vznikaly z entodermu hluboko ve faryngu, a do úst se přesunuly až sekundárně (např. Huisseune a kol., 2009; Fraser a kol., 2010). V posledních letech se však vědci přiklání spíše k tzv. „modifikované outside in“ teorii. Pozorování a mapování původu buněk pro vznik zubů u různých recentních druhů (např. myš, zebrafish, axolotl) totiž ukázalo, že ke vzniku zubů je potřeba interakce epitelu a mezenchymu buněk neurální lišty, a příliš nezáleží, zda je epitel ektodermálního či endodermálního původu (např. Huisseune a kol., 2009; Fraser a kol., 2010).

Ať už zuby evolučně povstaly jakoukoliv cestou, navždy jim zůstane statut jedné z nejvýznamnějších struktur, která umožnila rozrůznění obratlovců v obrovském rozsahu. Vznik

zubů a čelistí totiž znamenal otevření nových nik pro jejich nositele, odpovídajících predátorskému způsobu života. Jak tedy mohlo dojít k evolučnímu vymizení struktury tak zjevně výhodné v zápase o přežití, jakou zuby bezpochyby představují? K evoluční ztrátě chrupu navíc došlo hned několikrát nezávisle na sobě, a u úplně odlišných skupin (Obr. 1). Podle Davit-Béal a kol. (2009) k tomu mohlo dojít díky paralelnímu výskytu jiných, preadaptovaných struktur, jakými jsou kupř. lepkavý jazyk, sáňkovité čelisti vhodné k drcení hmyzu, keratinózní zobáky, či jiné struktury.



Obr. 1 – Zjednodušený fylogenetický strom recentních obratlovců s vyznačenými bezzubými liniemi (červené), chybějící enamel (modré), redukce enamelu i zubů (zelená), výskyt keratinózních struktur (fialové K). Upraveno podle Davit-Béal a kol. (2009) a Gaisler a Zima (2007).

Tato bakalářská práce je pokusem zmapovat různé druhy keratinózních struktur, které se objevily u obratlovců jako náhrady klasických, tj. kalcifikovaných zubů, či jako jejich doplnění (Obr. 1). Zaměřila jsem se na popis stavby těchto rohovinových struktur a na možné mechanismy, které pravděpodobně vedli k jejich evoluci u daných skupin živočichů. Protože se u odlišných linií objevují struktury sobě navzájem podobné, budu o nich pojednávat právě na základě jejich fenotypové podobnosti. Na začátku tedy popíšu zobáky (hlavně pak rohovinové ramfotéky) ptáků a želv, jakožto asi nejnámější strukturu, která nahrazuje zuby. Poté se zaměřím na keratinózní aparát současných bezčelistnatých obratlovců, mihulí a sliznatek. Obě tyto skupiny zvířat jsou zajímavé tím, že jako jediní mají mnohobuněčné keratinózní zuby, které jak svým vznikem, tak u sliznatek dokonce i výskytem enameloidních proteinů, jsou podobné právě odontodám a tedy pravým zubům. Přestože tyto struktury nemůžeme homologizovat, primární přítomnost rohovinových zubů u těchto bazálních skupin naznačuje, že tvorba struktur z keratinu, běžně obsaženém v tělních buňkách, je logickou a nejspíš i nejjednodušší cestou, jak se vyrovnat se ztrátou kalcifikovaných zubů. Ústní aparát mihulí se také svým rozvržením podobá organizaci struktur ústního ústrojí žabích pulců. Na rozdíl od mihulí se však na pulcích orálních discích nacházejí jednobuněčné rohovinové zoubky a namísto kompaktních keratinózních lišt mihule mají pulci pouze rohovinový povrch čelistí. Rohovinové povrchy čelistí se dále vyskytují i u nejpočetnějších vodních obratlovců, ryb. Zde ale rohovinový povrch obvykle slouží pouze jako doplňková struktura kalcifikovaných zubů, vyskytujících se přímo v ústech, nebo hlouběji na žaberních obloucích. V některých skupinách, obzvláště u nadřádu *Ostariophysii*, se rohovinové povrchy čelistí vyskytují poměrně hojně a navíc jejich volná strana může být poseta jednobuněčnými výrůstky, tzv. unculi. Keratinózní struktury nahrazující zuby se vyskytují dokonce i u savců: filtračním aparátem velryb totiž není nic jiného, než rohovinové kostice.

2. Keratinózní ramfotéka zobáků

Zobák je pro širokou veřejnost asi nejznámější strukturou sloužící jako náhrada kalcifikovaných zubů. Tato struktura evolučně vznikla zcela nezávisle u dvou skupin blanatých obratlovců (amniot) – želv a ptáků (Obr. 1.). Keratinózní složku zobáku ovšem tvoří pouze jeho horní, viditelná vrstva, tzv. ramfotéka (viz níže). Zobák může zastávat mnoho funkcí, stejně jako chrup - ostrými hranami lze odstranit maso z kořisti, zatímco ztlustění ramfotéky v ústech umožňuje drcení, podobně jako savčí stoličky. Někteří druhy ptáků (např. *Corvus corone*, *Cactospiza pallida*) jsou dokonce schopny používat zobáky k ovládnutí primitivních nástrojů (klacky, kameny) používaných k získání potravy (kupř. Hunt, 1996).

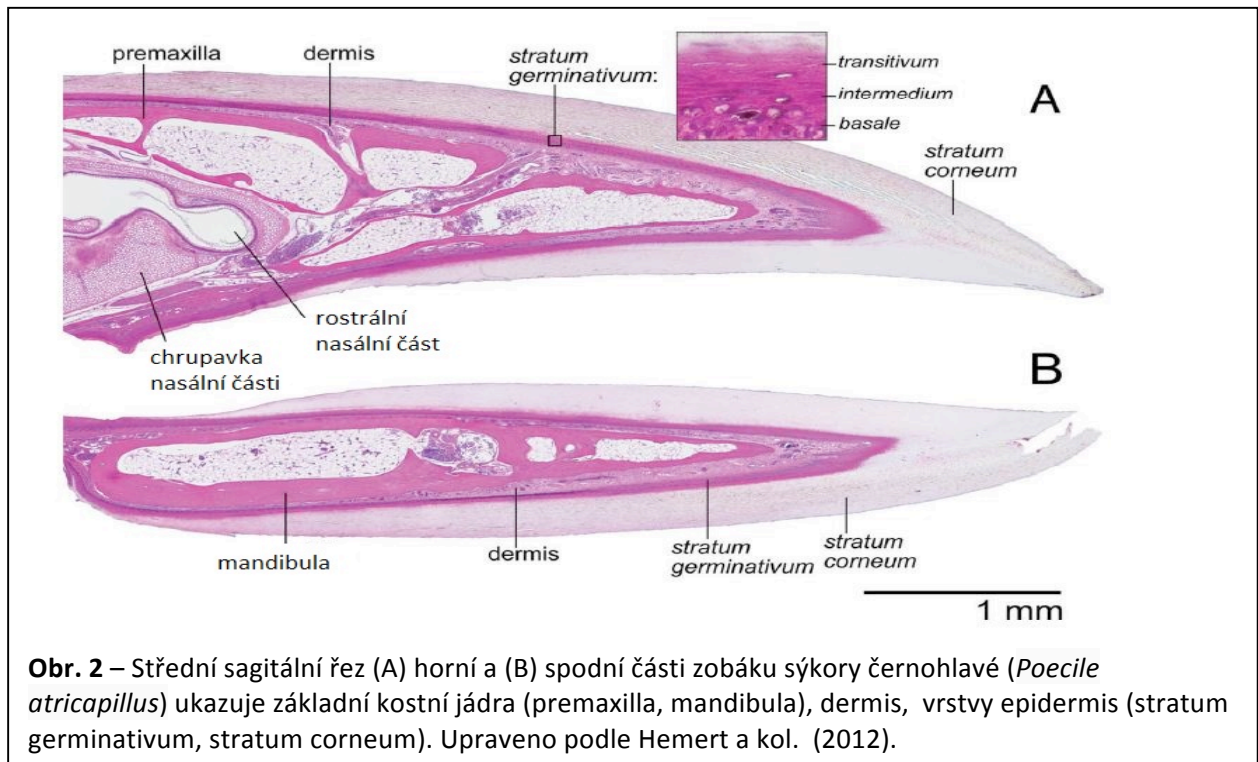
2.1. Stavba zobáků ptáků

Zobákem obecně nazýváme horní a dolní čelisti ptáků pokryty vnější, rohovinovou vrstvou, tzv. ramfotékou (Obr. 2.), která je tvořena především β -keratinem, typickým i pro plazy. Se svou strukturou (složený β -list) se tento protein liší od savčího α -keratinu (šroubovice) (Bragulla a Homberger, 2009). β -keratin v ramfotéce je tvrdší než v peří a drápech, což je nejspíše způsobeno jeho větší molekulovou hmotností (o 38 - 47 %), než je molekulová hmotnost keratinu v peří (Bonser, 1996). Podle některých autorů (Bonser a Witter, 1993) může být ramfotéka tvrdší i díky obsahu melaninu, a to zvláště v zimním období, kdy dochází k největšímu opotřebení.

2.1.1. Vnitřní zobák

Vnitřní kostěný zobák zasahuje téměř přes celou délku ramfotéky. Je složen z párových kostí - premaxila, maxila, nasale a palatinum v horní části, ve spodní pak z kostí dentale, articulare a angulare. Na vnější straně kostí, a to především laterálně a pouze do začátku nosní dutiny, jsou výběžky, jimiž prochází kolagenová vlákna. Tato tzv. Sharpeyova vlákna upevňují následující vrstvu dermis na kost (Genbrugge a kol., 2012). Pod pevným krytem z hutných kostí se nachází houbovitá kostní tkáň tvořená trabekulami. Prostory mezi nimi většinou vyplňuje buněčná tuková hmota, která však nemusí být všudypřítomná. Nachází se zde i velké cévy a větve trojklaného i obličejového nervu (Van Hemert a kol., 2012). Struktura uložení trabekul zaručuje, že se zobák při klovení, louskání a jiných úkonech nezlomí. Proto jsou trabekuly umístěny

v zobácích tak, aby nejčastější druh činnosti a jí vyvíjený tlak nezpůsobily poškození zobáku (Genbrugge a kol., 2012).



Na celém vnějším povrchu kostěného zobáku se vyskytuje vysoce vaskularizovaná, vazivová škára (dermis) (Obr. 2.). Netvoří však rovnoměrně tlustou vrstvu, ale směrem ke špičce zobáku se ztlušťuje. Přestože rozvrstvení škáry nelze pozorovat, u rozhraní s pokožkou je evidentně největší hustota kolagenních vláken. (Van Hemert a kol., 2012). Ve škáře se také vyskytují Herbstova tělíska i menší Grandryho tělíska. V obou případech jde o smyslové buňky – mechanoreceptory, které jsou seskupeny v blízkosti kostí a to především na zobákových hranách. Úplně pak chybí ve špičce zobáku, kde již není kost. Například u brodivých a vrubozubých ptáků slouží k prohledávání bahnitého dna při hledání potravy (Stettenheim, 2000). V oblasti zobákových hran, tomia je množství kapilár a menších cév vybíhajících v dermálních papilách skrz epidermis až po zrohovatělou tkáň ramfotéky. Tyto ostré, boční hrany a špička zobáku totiž vlivem opotřebování dorůstají po celý život, a proto je zde potřeba krevního zásobování více než v jiných částech. Dermis obsahuje i melanocyty, které ovlivňují zbarvení zobáku (Van Hemert a kol., 2012).

Horní vrstva zobáku – pokožka (epidermis) se skládá z různých, dobře rozlišitelných vrstev buněk dlaždicovitého epitelu (Obr. 2.). Živé buňky, při postupu jednotlivými vrstvami vzhůru, do své cytoplazmy ukládají převážně β -keratin a vápenité soli (Stettenheim, 2000).

Nakonec se z nich stanou úplně ploché, ale hlavně bezjaderné korneocyty zcela vyplněny keratinem. Korneocyty se nachází v tzv. stratum corneum - nejtlustší vrstvě pokožky, která tvoří ramfotéku. Melanocyty se vyskytují i v epidermis, zde jsou však menší a kompaktnější než ve škáře. Tvoří je granule melaninu uspořádané kolem jádra vyvíjejících se buněk. Největší koncentrace melanocytů je kolem hran a na povrchu zobáku, nejmenší v ústech (Van Hemert a kol., 2012).

2.1.2. Ramfotéka

Ramfotéku rozlišujeme na dvě části, a to na tzv. rhinotéku – pokryv horní čelisti a gnatotéku na čelisti spodní (Van Hemert a kol., 2012). Ramfotéka není pouze pevnou strukturou. Rhinotéka většiny ptáků obsahuje i flexibilní zónu, a například vodní ptáci (plameňáci, vrubozobí) mají ramfotéku tenkou, kožovitou, ale bahňáci již tvrdou, s pouze měkkou špičkou. Na okrajích obou čelistí se vyskytují řezné hrany – tomia. Ty bývají modifikovány podle potravních specializací jednotlivých ptáků. Obvykle jsou více či méně ostré, mohou ale na svém povrchu nést i různé výběžky pro cezení vody (vrubozubí) nebo držení kořisti (rybožraví) (Stettenheim, 2000).

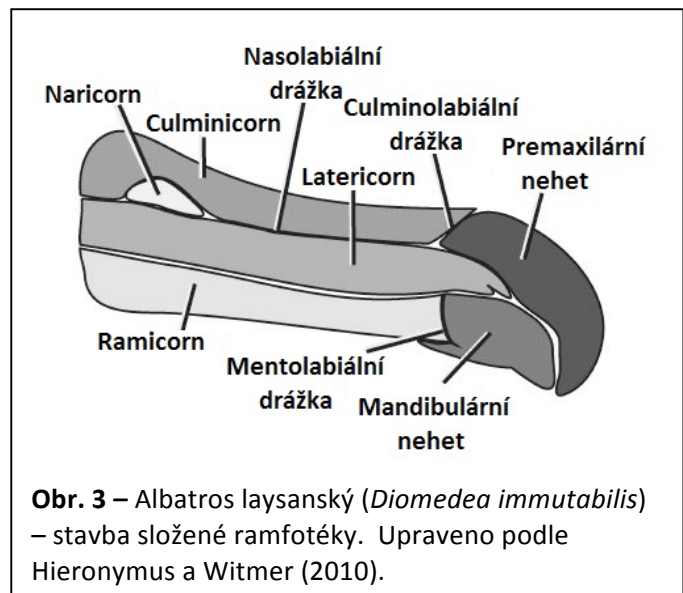
Vrstva korneocytů je více méně stejně široká, jen v oblasti patra, tomia a špičky zobáku je silnější, nejtenčí pak v oblasti nozder. Například u pěnkavek je nejširší vrstva korneocytů na rohovinovém patře (Genbrugge a kol., 2012). Na patře totiž mohou být vytvořeny řady příčných i podélných lišt, ostny či jiný výběžky pomáhajících zpracovat (papoušci, pěnkavy, strnadi) či ulovit potravu (rybožraví) (Stettenheim, 2000). Od báze po špičku se také mění tvar zrohovatělých buněk. V prenasální oblasti získávají korneocyty kulatější tvar než na laterálních stranách hran a špičky zobáku, (Van Hemert a kol., 2012; Genbrugge a kol., 2012) na kterých dochází k největšímu opotřebení a proto i prasklinkám a nižší adhezivitě buněk. Na bázi zobáku je pak postupně tvrdá ramfotéka nahrazena měkkou kůží, takzvaným ozobím. To může v různé míře překrývat nozdry vyskytující se obvykle v kaudální třetině zobáku. Někteří ptáci (papoušci, krkavci) mají ozobí opeřené, většinou je však lysé, často výrazně zbarvené (holubi, dravci, hokovití) (Van Hemert a kol., 2012; Stettenheim, 2000). Na ramfotéce se však vyskytují i všelijaké další modifikace v podobě štítků, hřebenů a hrotů v různých částech zobáku. Jsou však většinou typické pro jednotlivé druhy a jejich výčet by přesahoval rozsah této práce.

2.1.3. Složená ramfotéka

Ne všichni ptáci mají celistvou ramfotéku. Evolučním vývojem ramfoték se zabývali kupř. Hieronymus a Witmer (2010), kteří tvrdí, že původnějším vývojovým stupněm byla takzvaná složená ramfotéka. Ta se skládá z plátů rozdělených více či méně výraznými a početnými drážkami, které jsou většinou patrné i na kostěném podkladu, třeba jako série foramen pro větve nervů a cév. Tak byl například zjištěn výskyt dělených ramfoték i u předků dnešních ptáků, *Ichthyornise* a *Hesperornise*. Dále jsou také často přítomny u dnešních běžců. U letců, konkrétně nadřádu *Galloanserae*, je to však se složenými ramfotékami trochu složitější. Vrubozubí (*Anseriformes*) totiž mají drážky až přehnaně vyvinuté, naopak u hrabavých (*Galliformes*) jsou mělké a nevýrazné. Typickými zástupci složených ramfoték jsou také trubkonosí (*Procellariiformes*) i některé čeledi z řádu veslonohých (*Pelecaniformes*).

Na složených ramfotékách můžeme rozlišovat tři základní drážky (Obr. 3.). Na horní čelisti jsou to: 1) culminolabiální – oddělující premaxilární nehet od culminicornu a 2) nasolabiální – probíhající mezi latericornem a premaxilárním nehtem, culminicornem a pod naricornem chránícím nozdry. Na spodní čelisti je pouze mentolabiální drážka dělící mandibulární nehet od ramicornu. Její poloha často odpovídá culminolabiální drážce horní čelisti.

Tyto drážky jsou důležité při růstu jednotlivých rohovinových plátů, které nerostou kolmo k dermis, jak by se mohlo zdát, ale spíše směrem k jednotlivým tvarům na zobáku – například k tomu. Proto by mohly být deformovány vzniklým vnitřním napětím, čemuž mají zabránit právě měkké drážky, do kterých zasahuje živá, bazální vrstva pokožky. Tak dochází k deformacím zde, a jednotlivé pláty se mohou v pořádku vyvíjet. U celistvých ramfoték je ztráta drážek vynahrazena tím, že povrch kostěného zobáku je konzistentní, a tudíž umožňuje celé ramfotéce jednotný růst.

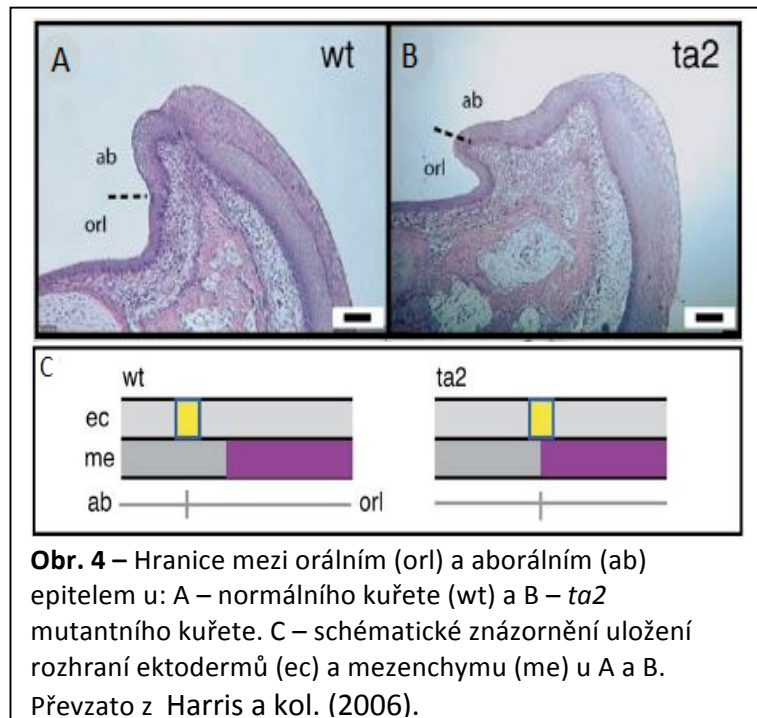


2.2. Evoluce ztráty zubů u ptáků

Je všeobecně přijímáno, že se ptáci vyvinuli z dinosaurů v období svrchní jury. To dokazují i nálezy opeřených Maniraptorů, jako například Caudipteryx či Microraptor (Gaisler a Zima, 2007). Tito dinosauri měli plně vyvinuté čelisti obsahující zuby. Proč si však i jejich potomci „neponechali“ tuto významnou strukturu a jak namísto ní evolučně vznikl rohovinový zobák?

Názorů na problematiku této evoluce je více, navzájem spolu ale úzce souvisí. Například nejedna práce na toto téma vyzdvihuje roli posunu vzájemných iniciačních center epitelu a mezenchymu, protože se ukázalo, že epitel i mezenchym ústní dutiny ptáků mají během raného vývoje stále genetický potenciál pro tvorbu zubů. V článku Harris a kol. (2006) proto porovnávají normální kuřata a kuřata s mutantním genem *talpid* (*ta2*), u kterých došlo k mediálnímu posunu rozhraní mezi orálním a aborálním epitelem tak (Obr. 4.), že v tomto místě vznikla dentální lamina s výběžky vyplněnými dentálním mezenchymem a cévním zásobením. Tím ale tvorba zubů u *ta2* mutanta končí, protože u ptáků jsou geny pro tvorbu enamelu a dentinu inaktivní. Přesto jsou tyto výběžky nápadně podobné prvním zubům krokodýlů, z čehož lze usuzovat, že ke ztrátě chrupu mohlo dojít právě díky posunu iniciačních center obou vrstev a tudíž ke zrušení genové indukce

mezi epitelem a mezenchymem (Harris a kol., 2006; Davit-Béal a kol., 2009; Louchart a Viriot, 2011). Bylo také zjištěno, že schopnost tvořit tyto výběžky si zachoval pouze orální mezenchym. U mutanta *ta2* tak bylo výběžky možno pozorovat buď po odstranění ramfotéky, nebo na laterálním rozhraní orálního a aborálního epitelu – tedy tam, kde se vyskytují živé buňky (Harris a kol., 2006; Louchart a Viriot, 2011).



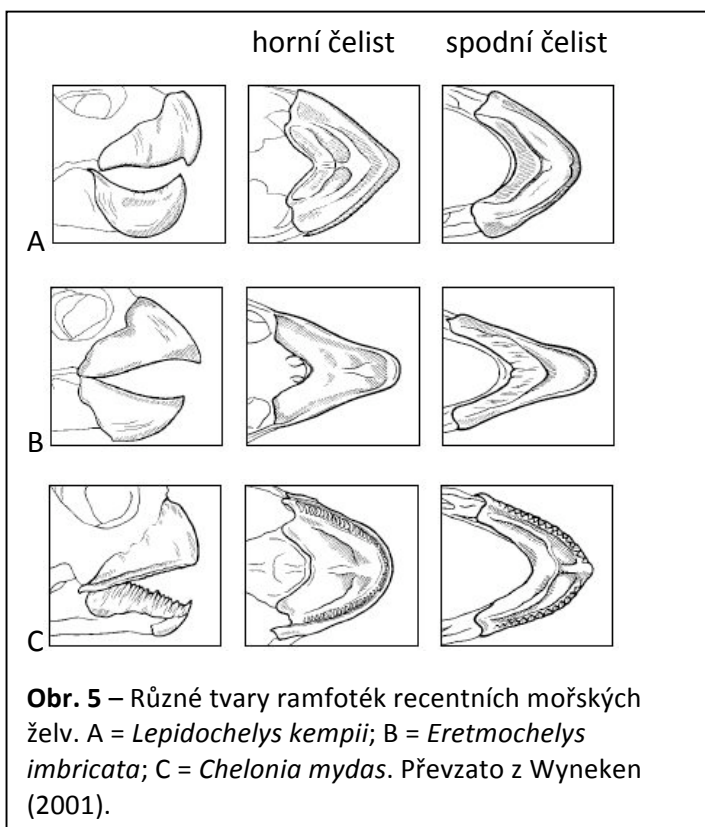
2.2.1. Nahrazování zubů zobákem ve fosilním záznamu

Evolučním vznikem ramfotéky se zabýval např. Louchart a Viriot (2011). Podle nich první praptáci měli plně vyvinut chrup, stejně jako jejich nejbližší žijící příbuzní – krokodýli. S evolucí se ale zuby začaly postupně redukovat. Během pozdní jury či křídly docházelo nezávisle k redukci zubů nejméně u šesti druhů. Z toho tři nejspíše představují mezičlánky a nejméně čtyři druhy ztratily chrup úplně. V nejbazálnějších skupinách, včetně *Enantiornithes*, začínaly mizet zuby nejdříve v zadní části zobáku – na maxilách a proximálnějších koncích premaxil a dentale. Naopak zástupci z kladu *Ornithuromorpha* – zahrnujících i předky dnešních ptáků ze skupiny *Neornithes*, ztráceli dentici nejdříve v distálních oblastech premaxil a až posléze ztráta pokračovala dále na maxily a dentale. Čím se taxony nachází blíže ke skupině *Neornithes*, tím spíše mají zcela bezzubé premaxily. Kvůli chybějícím fosiliím z křídly nelze však přesně určit kdy a jak došlo k úplné bezzubosti u *Neornithes*. Zda ještě u společného předka, nebo až nezávisle u každé skupiny – běžců a letců.

2.3. Stavba zobáku u želv

Další známá skupina obratlovců, u které došlo ke ztrátě kalcifikovaného chrupu a zároveň evoluci zobáku, jsou želvy. Stejně jako u ptačích zobáků, jsou zobáky želv také tvořeny rohovinovou ramfotékou (viz výše) pokrývající kosti maxily, premaxily a vomer na horní čelisti, na spodní čelisti pak dentale.

Ramfotéky želv se mohou lišit ve spoustě znaků: tloušťce vrstvy a struktuře povrchového keratinu celého zobáku (stavba jemná, střední, silná), i jen řezných hran s hladkým či vroubkovaným povrchem. Dále pak ve tvaru zobáku (úzký a delší, širší, kratší a oblý, zahnutí špiček, spodní žlábkovitá ramfotéka) a strukturách na orální straně ramfoték -

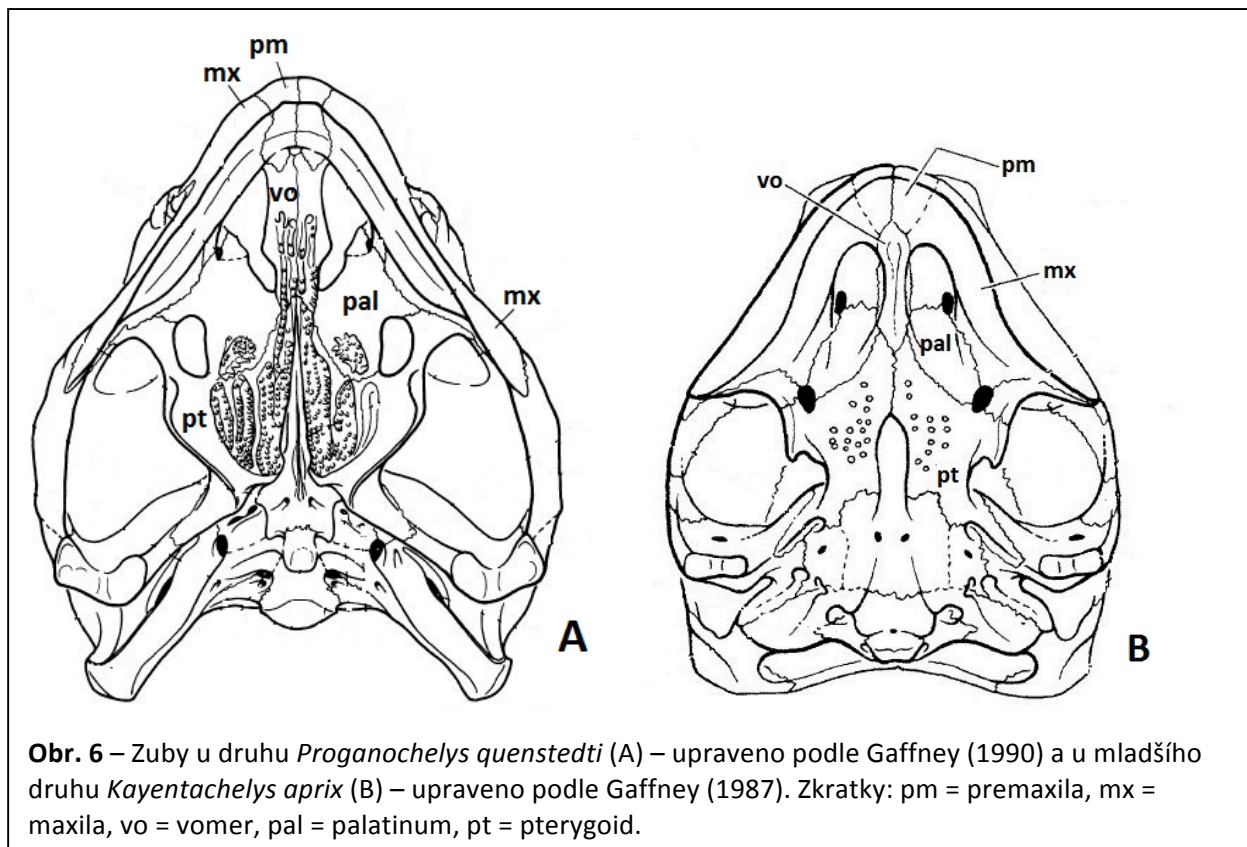


množství a uložení hřebenů, zda jsou tyto hřebeny hladké či mají hrbolky, výskyt ztlustěnin na drcení potravy nebo naopak prohlubní (obvykle na spodní části) pro výstupky protilehlé části zobáku (kupř. Wyneken, 2001). Proto mohou ramfotěky sloužit i jako druhově-specifický znak (Obr. 5.).

2.4. Evoluce ztráty zubů u želv

Recentní želvy jsou všechny bezzubé, přestože fosilní záznam ukazuje ozubené čelisti jejich předků – například dvou nejstarších zástupců z Triasu (220 milionů let), *Odontochelys semitestacea* z Číny a *Proganochelys quenstedti* z Německa. *Odontochelys* měla zuby sice malé a kónické, zato na obou čelistech. Jednotlivě na premaxilách, maxilách i dentale, zato několik řad zubů na kostech horní čelisti – vomeru, palatinu a pterygoidu (Li a kol., 2008). U *Proganochelys* lze také nalézt zbytky premaxilárních zubů, hlavně pak ale zuby na vomerech a palatinech (Obr. 6. A) (Gaffney, 1990; Joyce 2007), které však mají zvláštní typ uchycení do kosti přes palatální výběžek (Kordikova, 2002). Tyto druhy byly nejspíš spojovacím článkem mezi plazími předky bez krunýře a želvami, jak je známe dnes. Všechny další vymřelé druhy, dokonce i krátce po rozdělení želv na *Pleurodira* a *Cryptodira*, které proběhlo během období jury (před 200 – 180 milióny let), měly zuby přítomny již pouze na pterygoidech (Joyce, 2007). Toto platí i pro *Kayentachelys aprix* (Obr. 6. B), pravděpodobného předka skupiny *Cryptodira* z časné jury, nalezeného v Arizoně (Gaffney a kol., 1987). Ale už první nezpochybnitelní zástupci skupiny *Pleurodira* z křídly (145 milionů let) byli zcela bezzubí (Joyce, 2007). Ztrácení zubů bylo postupně kompenzováno růstem rohovinové ramfotěky, jenž lze pozorovat již u výše zmíněné *Proganochelys*, která ramfotékou nahradila zuby maxil a premaxil (Davit-Béal a kol., 2009).

Příčinami, které mohly vést ke ztrátě chrupu u želv, se zabýval kupř. Tokita a kol. (2012). Pokoušel se pomocí srovnávání genové exprese během embryonálního vývoje zobáků želv, ptáků a čelistí krokodýlů ukázat, jak u želv došlo ke ztrátě zubů. Zjistil, že vyjma genu *Shh*, důležitého pro proliferaci buněk, se v želvím mandibulárním epitelu spodní čelisti exprimuje mnoho dalších genů (jako např. *Fgf8*, *Pax9*, *Bmp4*, *Msx1* a *Dlx5*), které normálně zodpovídají za vznik zubů kupř. u krokodýlů. Ukazuje se tedy, že želvy obsahují běžné odontogenické regiony orálního epitelu, avšak chybějící exprese *Shh* neumožňuje expresi dalších, návazných signálních faktorů důležitých při interakcích mezi epitelem a mezenchymem a tak zabraňuje tvorbě zubů.

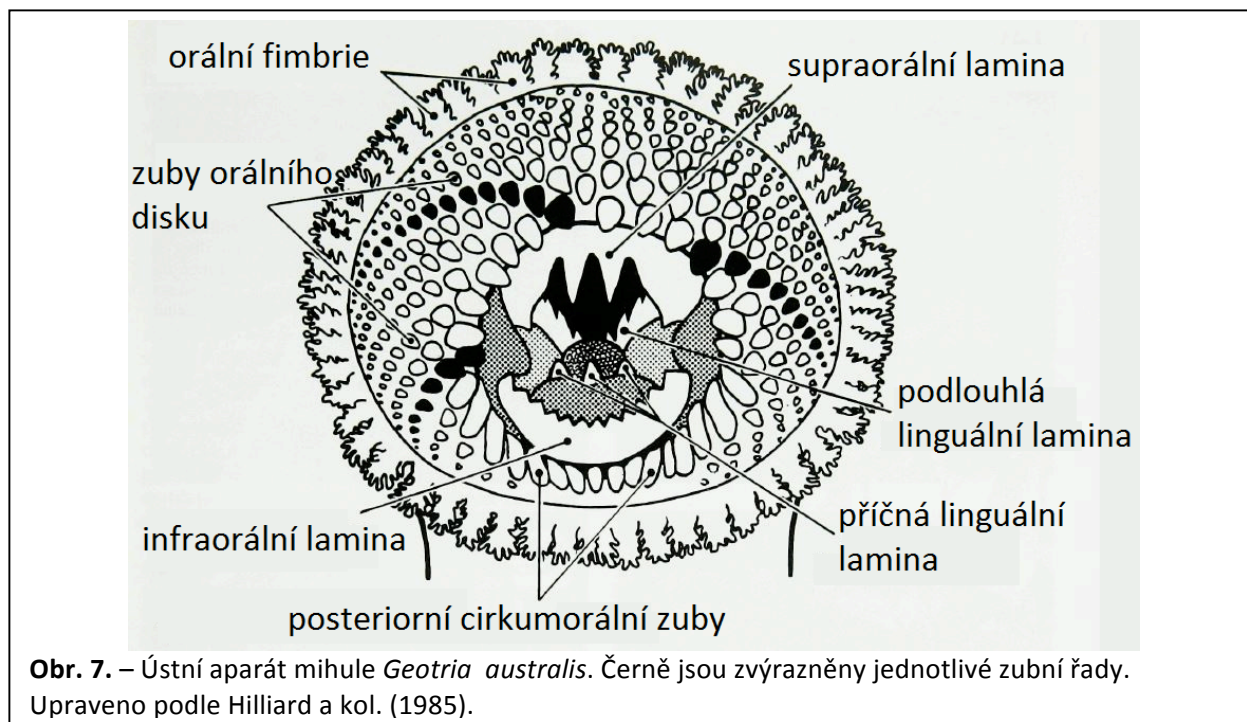


3. Mihule

Mihule patří společně se sliznatkami mezi bazální obratlovce (Obr. 1) postrádající čelisti. Mihule mohou být sladkovodní i mořské, svůj život ale vždy začínají jako sladkovodní larvy živící se filtrováním potravy. Během metamorfózy mihulí dochází k tvorbě specializovaného orálního disku, který zajišťuje řezání a škrabání tkáně hostitelů (kupř. Gaisler a Zima, 2007). Vývojem orálního disku během metamorfózy mihulí se zabývalo více autorů. Manion a Piavis (1977) se zaměřili na druh *Petromyzon marinus*, Yoshie a Honma (1979) na druh *Lampetra japonica*, a Lethbridge a Potter (1981) i Hillard a kol. (1985) si zvolili druh *Geotria australis*. Přesto jsou tyto druhy v jednotlivých procesech, co se načasování vývoje různých struktur orálního disku, ústní dutiny a speciálního pístovitého jazyka týče, popsány značně podobně.

Vnější obvod orálního disku bývá lemován jednoduchým epitelem uspořádaným do výběžků nazývaných papily (Manion a Piavis, 1977; Yoshie a Honma, 1979; Lethbridge a Potter, 1981) či fimbrie (Hillard a kol., 1985) (Obr. 7.). Papily produkují hlen (Hillard a kol., 1985), díky kterému jsou mihule schopny se udržet na těle hostitele ještě před plným prořezáním chrupu (Manion a Piavis, 1977).

Na orální papile se dále vyskytují malé, keratinózní zuby. Špičaté zuby jsou uspořádány v řadách kolem ústního otvoru, ty lopatovité jsou nahloučeny v posteriorní řadě (Obr. 7.) (Hillard a kol., 1985). Okraje zubů jsou přichyceny korálnímu disku epiteliální tkání, označovanou jako gingiva (Manion a Piavis, 1977). Dále za zuby se nachází série keratinózních lamin (Obr. 7.) - příčné a podélné linguální laminy a supraorální a infraorální lamina, které jsou upevněny pomocí chrupavek u vstupu do ústní dutiny (Lethbridge a Potter, 1981; Hillard a kol., 1985).



3.1. Vývoj a stavba rohovinových zubů

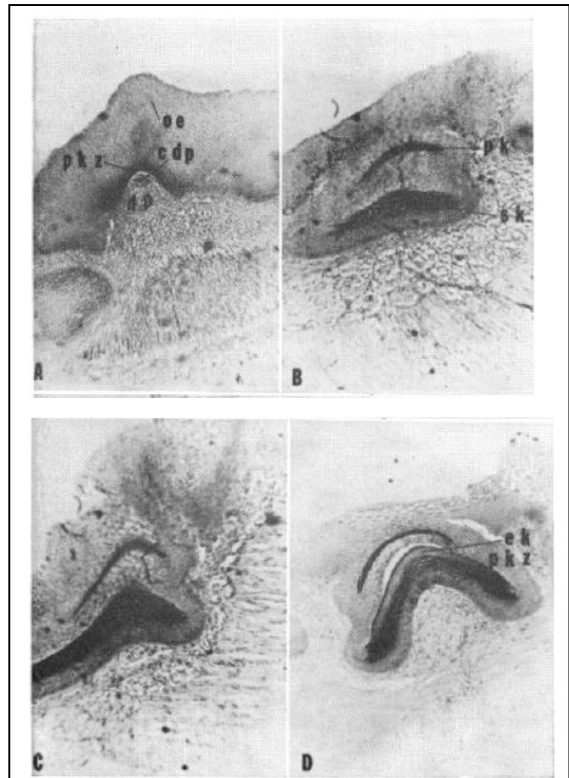
Protože každý autor používá jiné číslování a pojmenování životních fází mihule bez bližšího vysvětlení, rozhodla jsem se používat jejich označení podle Manion a Piavis (1977) a práce autorů Yoshie a Honma (1979) a Lethbridge a Potter (1981) převést do tohoto názvosloví podle výsledků jejich pozorování. Keratinózní zuby mihulí vznikají, podobně jako pravé, tj. kalcifikované zuby, díky interakci mezi epitelem a mezenchymem (Obr. 8.). Tak to alespoň popisují všichni tři výše uvedení autoři na základě mikroskopického pozorování. Zda se však v případě mezenchymu jedná o buňky mezodermy, nebo buňky neurální lišty nelze říci, protože v době vzniku článků to autoři ještě příliš nerozlišovali. Již během metamorfózy dochází na rozhraní epitelu a mezenchymu ke kondenzaci mezenchymatických, kvádrových buněk a k vytvoření kónické dermální papily. Posléze i epiteliální buňky z tohoto rozhraní začínají produkovat

keratin a formovat kuželovité primární zuby (Obr. 8.). Z buněk spodní vrstvy primárních zubů se vytvoří buňky stelární, které budou oddělovat jednotlivé náhradní zuby navzájem, i od spodních vrstev prekeratinu a nediferencovaných buněk (Obr. 9.). Horní rohovinová vrstva primárního zubu je tvořena dvěma nebo třemi buňkami na jeho bázi, jejichž počet se na špičce zubu zvyšuje na čtyři až osm buněk (Alibardi a Segalla, 2011). Povrch primární keratinové vrstvy má také rozdílné vzory mezi bazální částí a špičkou. Na bázi zubu pokrývá síť mikrohřebenů, širokých 0,3 μm , volný povrch každé buňky. Směrem k hrotu se tyto mikrohřebenů snižují. Buňky na bázi mají i okrajový hřeben, za kterým se nachází mělká drážka (Yoshie a Honma, 1979).

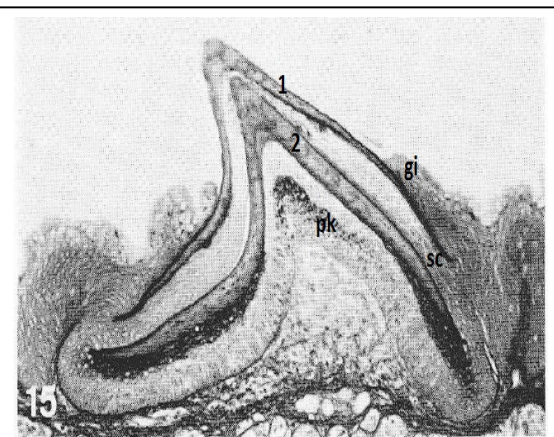
Teprve u mihulí s dokončenou metamorfózou se začínají tvořit i zuby náhradní (proces stejný jako u primárních zubů, viz výše), kterých může být i

několik nad sebou. Tyto sekundární zuby mívají obvykle keratin čtyři až pětkrát silnější než zuby primární, přestože kónický tvar zůstává. Zuby u časně metamorfovaných mihulí mají malou, tupou špičku, která je mnohdy to jediné, co ční nad epitelem (Obr. 9.).

Další vývojová stádia – brzká parazitární fáze i dospělci před vytřením nemají zuby výrazně odlišné od předešlých vývojových fází. Zuby jsou jen větší, s ostrými, zahnutými špičkami s hladším povrchem, silněji keratinizovány a často částečně průhledné (Manion a Piavis, 1977; Yoshie a



Obr. 8. – Příčné řezy vznikajících zubů mihule během metamorfózy (A) a v časně metamorfovaném jedinci (B, C, D). Zkratky: oe = orální epitel; pkz = prekeratinózní zóna; cdp = kondenzace dermálních buněk; dp = dermální papila; pk = primární keratinózní vrstva, sk = sekundární vrstva keratinu; ek = brzká keratinózní zóna. Převzato z Manion a Piavis (1977).



Obr. 9. – Příčný řez hotovým zubem mihule. Vysvětlivky: 1 a 2 = vrstvy keratinu; pk = prekeratinová vrstva; sc = stelární buňky; gi = epiteliální gingiva. Upraveno podle Yoshie a Honma (1979).

Honma, 1979). Větší změny však nastaly v mikrostruktuře keratinózních buněk. Mikrohřebeny na bázi jsou postupně směrem ke špičce nahrazeny malými nerovnoměrně rozloženými otvory měřícími v průměru 0.1 - 0.2 μm (Yoshie a Honma, 1979).

Po vytření jedinci druhu *Petromyzon marinus* brzy umírají, proto i zuby v této fázi značně degenerují. Primární zuby mají tloušťku jedné třetiny předcházejících dvou fází, ale k nejvýraznější změně dochází u buněk prekeratinózní zóny, u kterých se již nedají rozlišit obrysy ani jádra. Také náhradní zuby zde nejsou plně formovány (Manion a Piavis, 1977).

Počet náhradních zubních kuželů je variabilní. Závisí na typu zubů, fázi vývoje a pravděpodobně i fyziologickém stavu zvířete. U mihulí, které jsou již déle metamorfovány, ale ještě nezačaly přijímat potravu, mají jedinci *P. marinus* jeden zub primární a tři až čtyři náhradní (Manion a Piavis, 1977), zatímco u *Lampetra japonica* byly pozorovány pouze dva zuby náhradní (Obr. 9.) (Yoshie a Honma, 1979). Počty sekundárních zubů bývají obvykle ve všech stádiích větší na jazyku, než orálním disku. Jazyk totiž hraje hlavní roli při škrábání rybí tkáně, proto zde musí být zuby nejčastěji obměňovány. Stárnoucím mihulím však chybí náhradní zuby i na jazyku (Manion a Piavis, 1977).

Tvaru zubů, ale převážně škárabacímu mechanismu jako takovém, se u druhu *Geotria australis* věnoval Hillard (1985). Zjistil, že u jedinců, kteří nejsou připojeni na kořist, má většina zubů na ústním disku lopatkovitý tvar, a jejich více špičatý, volný konec směřuje směrem dolů a mírně dovnitř (Obr. 7.). U posteriorního okraje ústního otvoru, hned pod úrovní infraorální laminy, jsou zuby mnohem protáhlejší než jinde na disku (Obr. 7.). Nicméně, jejich dlouhý a zvednutý vnitřní okraj je velmi ostrý.

3.2. Keratin zubů

Naproti dobře prozkoumanému složení keratinu a stavby kožních derivátů amniot, jako jsou vlasy, chlupy, peří, nehty, rohy a podobně (např. Bragulla a Homberger, 2009; Sawyer a kol., 2000), jsou anamniota v šířce podobných výzkumů pozadu. Keratinem v mihulích zubech mihule *Lenthenteron zanandreae* se například zabýval Alibardi (2011), jehož studie potvrdila, že v horních vrstvách zubů probíhá intenzivní kornifikace.

Mihule mají ve zralých zubech hlavně α -keratin, který skoro neobsahuje -SH skupiny. To naznačuje, že na síru bohaté proteiny zcela oxidují a mohlo by to vysvětlit zvýšení elektronové hustoty (Alibardi 2011). Dalším zajímavým zjištěním byla intenzivní pozitivní imunoreakce

s keratinem-10 (K10), což znamená, že tento protein, typický pro zrohovatělé vrstvy savčí pokožky, je rovněž přítomný v rohovinových zubech mihule. Naopak ve zbývající, nezrohovatělé mihulí epidermis, se K10 nenašel. Je také pravděpodobné, že v tvrdých derivátech ryb a kruhoústých je zvýšení elektronové hustoty odvozeno z depozice nekeratinózních, na cystein bohatých fKAPs = Keratin associated proteins (zde označených písmenem f jako fish = rybí), mezi keratinózní tonofilamenta a na buněčné membrány keratinocytů.

V přechodných keratinocytech, vrstvě buněk před vstupem do vrstvy stratum korneum, se keratinové svazky soustředily spíše na periferii buňky. Tmavé korneocyty pak ukázali nepravidelně ztloustlou plazmatickou membránu v důsledku ukládání elektronově hustého materiálu, který zde také zajišťuje spojení mezi buňkami. Korneocyty samozřejmě obsahovaly i ve tvaru variabilní svazky keratinu - od velmi nepravidelných pásů, až po kulaté, organely připomínající granule.

3.3. Vývoj a stavba keratinózních lamin



Obr. 10 – Supraorální lamina a příčná linguální lamina s typickými výběžky. Převzato z Hilliard a kol. (1985).

Lethbridge a Potter (1981) se také zabýval vývojem keratinózních lamin orálního aparátu mihule *Geotria australis* během metamorfózy a následujících životních fázích. Primordia všech lamin se objevují již v brzké fázi metamorfózy. První se začíná objevovat supraorální lamina. Vzniká diferenciací mezodermálních buněk, ale (viz výše) převážně v místech vývoje chupavky, na kterou se může uchytit. Podpůrné chrupavky linguálních lamin na konci brzké metamorfózy ještě vyvinuty nejsou. Dokonce i primordium infraorální lamina vzniká až na přelomu brzké a pozdní

metamorfózy.

V pozdní fázi metamorfózy se začínají laminy ostře vymezovat vůči okolí díky vzniku primárního keratinózního kužele, produkovaného horní epitelální vrstvou. Když dojde k prořezání primární laminy nad epitel, začnou se pod ní vyvíjet náhradní rohovinové laminy. Ty jsou od sebe navzájem, stejně jako zuby na orálním disku, odděleny stelárními buňkami.

Tvary takto vytvořených keratinózních lamin popsal u stejného druhu Hillary (1985). Velká infraorální (na ventrální straně) a supraorální (na dorzální straně) laminy jsou zřetelně viditelné útvara při vstupu do ústní dutiny (Obr. 7). Infraorální lamina nese 8 - 11 širokých a zároveň krátkých hrbolků, zatímco lamina supraorální má malé hroty na bočních lopatkovitých rozšířeních a pár mnohem větších výčnělků v části střední (Obr. 7., 10.). Na jediné příčné linguální liště jsou tři hrubé a špičaté výčnělky (Obr. 7., 10) zatímco na podélných linguálních lamelách je ostrých výčnělků několik (Obr. 7.). Příčné i podélné lamely jsou nesený pístovitým jazykem.

Na zadní straně povrchu supraorální laminy, v oblasti mezi bočními rozšířeními a mediálními výčnělky, i mezi nimi samotnými, je vždy hluboká drážka (Obr. 10). Tvar, velikost i umístění těchto tří drážek přesně odpovídá tvaru a postavení tři velkých, širokých, špičatých hrbolů příčné linguální laminy (Obr. 10).

Centrální hrot příčné linguální laminy je největší ze všech tří výběžků u migrujících, a jedinců přijímajících potravu. U pohlavně zralých dospělců však bude tento hrbol v době tření při každé obměně laminy menší a užší, až zmizí úplně (srovnání Obr. 10. a 11.). Naproti tomu vnější hrbolky příčné laminy jsou delší, a to zejména u pohlavně zralých samců (Obr. 11.).

Výběžky supraorální laminy také v této době prochází změnami. Hrbolky z bočního rozšíření se ztrácejí, naopak dva mediální hroty, se zvláště u samic rozšíří tak, že dojde ke ztrátě typických rýh (srovnání Obr. 10 a 12). Hrbolky ostatních lamel se také během této přeměny, stejně jako zuby na orálním disku, zmenšují a stávají tupějšími.



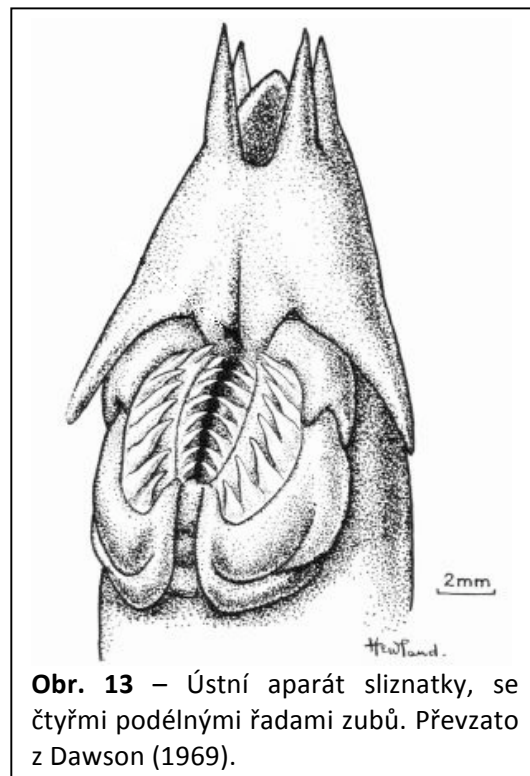
Obr. 11 – Příčná linguální lamina v době tření. Vymizení prostředního a zvětšení krajních hrbolů. Převzato z Hilliard a kol. (1985).



Obr. 12 – Supraorální lamina v době tření. Ztráta postranních hrbolů a vymizení rýh mezi hrboly středními. Převzato z Hilliard a kol. (1985).

4. Sliznatky

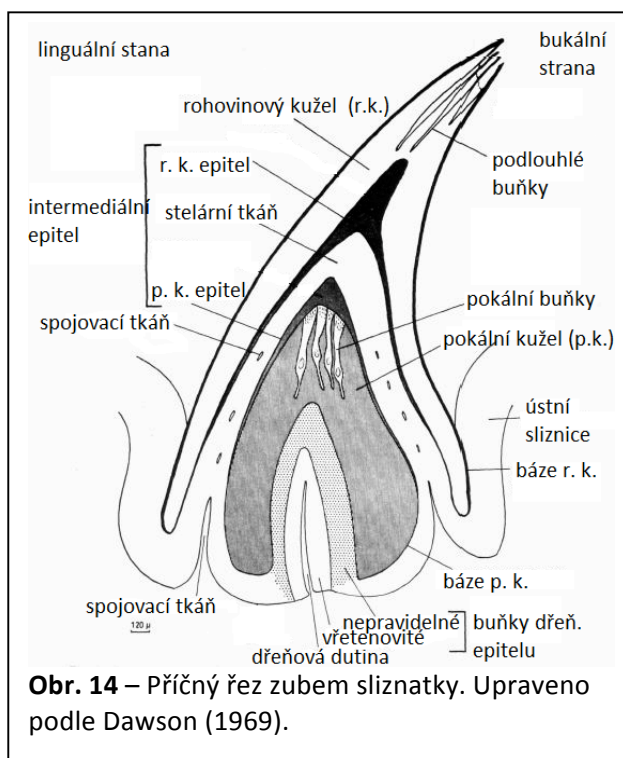
Zuby sliznatek jsou tvarem podobné zubům jejich nejbližším příbuzným, a to mihulí (Obr. 1.), mají ovšem poněkud složitější stavbu. Zuby sliznatek se sice také skládají z vnějšího rohovinového kužele, ale namísto hned následujícího náhradního zubu mihulí se u sliznatek nachází ještě vnitřní kužel, tvořen tzv. pokálními buňkami (Obr. 14.). Uvnitř pokálního kužele je i pulpa, vyplněna tkání strukturně podobnou pojivové - skládá se z jedné nebo více vrstev kuželovitých buněk obsahujících množství lipidů. Zuby má sliznatka uspořádány ve čtyřech podélných řadách (Obr. 13.), vyrůstajících z ústní sliznice pokrývající chrupavku nahrazující čelist (Dawson, 1969; Slavkin a kol., 1983).



Obr. 13 – Ústní aparát sliznatky, se čtyřmi podélnými řadami zubů. Převzato z Dawson (1969).

4.1. Vývoj a stavba rohovinových zubů

Stavbě a vývoji keratinózních zubů sliznatky se zabýval kupř. Dawson (1969) a to konkrétně u druhu *Myxine glutinosa*. Plně vyvinutý, bíle zbarvený pokální kužel obsahuje tři druhy buněk – vnější, obalové buňky které tvoří hlavní substrát zubu, závěsné buňky připojující k sobě navzájem sousední kužely a vnitřní vrstvu protáhlých, nekeratinizovaných buněk pokálních (Obr. 14.). Pokální buňky jsou mimo jiné plné lipidových kapének, a vyskytují se ve vrcholku kužele. Povrchová struktura tohoto kužele je jemná, ale přesto odolná vůči tlaku.



Obr. 14 – Příčný řez zubem sliznatky. Upraveno podle Dawson (1969).

Další vrstvou je intermediální epitel (Obr. 14.), oddělující kužel rohovinový od pokálního. Zde se také nachází vrstva stelárních buněk. Rohovinový kužel (Obr. 14.), přestože je mnohem více keratinizován oproti pokálnímu kuželu, je mu velice podobný co se typů a uspořádání buněk týče. Buňky obalové ale oproti všem ostatním obsahují pigmentové granule způsobující hnědožluté zbarvení zubu. Tyto granule nejspíš vznikly oxidací tukových kapének obsažených v předchozích, nezralých buňkách. Buňky závěsné jsou nepigmentované, a podlouhlé buňky jsou stejně jako stejně tvarované buňky pokální, umístěny ve špičce zahnutého kužele. Mezi epiteliálními buňkami na bázi kuželu a obalovými buňkami (u obou druhů kuželů, u pokálního však dochází jen k menším změnám v množství keratinu) je několik vrstev buněk, s různým množstvím a velikostí keratinových vláken. Jsou to bazální vrstva, vrstva trnovitých buněk a přechodová zóna, ve které dochází ke zrání buněk obalových. Závěsný region je tvořen pouze těmito přechodovými buňkami. Rozhraní zralých a zrajících buněk lze snadno pozorovat při barvení buněčných jader, která se ve zralých buňkách již neobarví.

I u sliznatek byl pozorován vývoj a obměna rohovinových zubů. K obměně zubů však dochází pravidelně, během života jednotlivých zvířat, ne jako u mihulí, kdykoliv je potřeba. Celý proces trvá zhruba 90 dní a postupně v něm dochází ke ztrátě rohovinového kužele a následně i intermediálního epitelu. Pokální kužel se prodlužuje, jeho buňky silně keratinizují a z lipidových kapének v nich obsažených se stávají pigmentové granule. Tyto buňky pak plně nahradí starý rohovinový kužel. Zároveň musí docházet ke tvorbě nového pokálního kužele. Ten se vyvíjí z dřeňových buněk pokálního kužele, které nejsou ze začátku plně diferencovány, a zcela je obklopuje intermediální epitel, tvořen převážně stelárními buňkami. Jak ale buněk nového pokálního kužele přibývá, začínají se rozeznávat na obalové buňky obsahující malá keratinózní vlákna a pokální buňky vyplněny lipidy, tak ubývá i stelárního retikula. V této fázi se již začíná diferencovat nová pulpa. Jakmile je nový pokální kužel plně vyvinut ve všechny typy buněk (viz výše) i s náhradními buňkami v pulpě. Stelární retikulum skoro zaniklo a intermediální epitel je tvořen převážně epitelem obou nových kuželů (Dawson, 1969).

4.2. Keratin zubů u sliznatky

Sliznatky mají α -keratin obsahující jak cystein vázaný na -SH, tak i na -SS skupiny. -SS vázaný cystein je charakteristický pro zralý, tvrdý keratin, díky formování disulfidických můstků. Proto asi nikoho nepřekvapí, že je ho nejvíce v plně keratinizovaných obalových buňkách rohovinového kužele. Čím více se ale postupuje do buněčných nižších vrstev, tím zde přibývá

cysteinu vázaného na -SH skupiny. V závěsných a přechodových buňkách pokálného kužele se dokonce SS cystein nevyskytuje vůbec (Dawson, 1969).

Zajímavostí je, že pouze v extracelulárním prostoru rohovinového kužele byly lokalizovány enameloidní proteiny s vysokou molekulovou hmotností, ne však amelogeniny, podobně jako např. u žraloků. Odolnost zubu je tak u obou skupin nejspíš zajištěna právě strukturálně, díky vysoké molekulové hmotnosti enamelových proteinu, protože je třeba zdůraznit, že zuby sliznatek nejsou kalcifikované. Navíc i -SH skupiny typické pro keratin sliznatek a mihulí, se vyskytují i v enamelové matici savců. To naznačuje, že by sliznatky mohly být prvními obratlovci s geny pro enamel, vyskytující se u všech dalších obratlovců (kromě mihulí) (Slavkin a kol., 1983).

5. Orální aparát žabích pulců

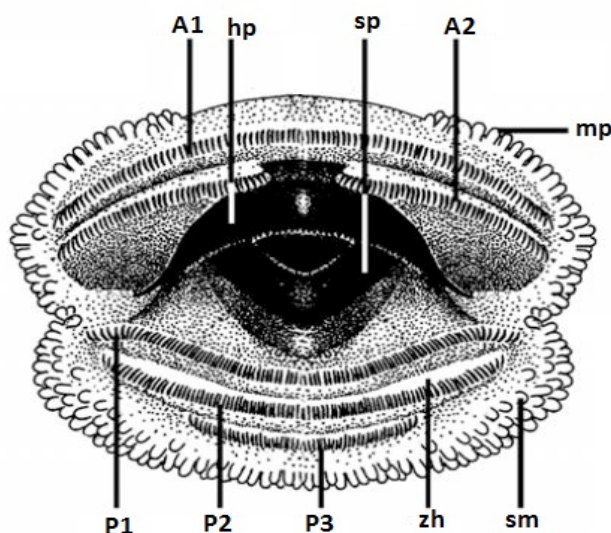
Zatímco zástupci dvou skupin obojživelníků, červoři i ocasatí obojživelníci mají pravé zuby již v larválních stádiích, situace u třetí skupiny, žab, je poněkud složitější a zajímavější (kupř. Davit-Béal a kol., 2007). Jedinou čeledí žab v dospělosti zcela postrádajících kalcifikované zuby jsou ropuchy (*Bufo*nidae) (Obr. 1.) (kupř. Shaw, 1979; Davit-Béal a kol., 2007; 2009), takže nemusí být příliš překvapivé, že jejich larvy také nemají mineralizovaný chrup. Zajímavější ovšem je, že ani pulci ostatních žabích čeledí nemají tyto zuby. Zatímco dospělé žáby k lovu používají vystřelovací, lepivý jazyk, pulcům by ve vodním prostředí příliš k lovu nepomohl. Proto se vydali jinou cestou. Jejich orální aparát je vybaven keratinózními strukturami – řadami jednobuněčných zoubků a povrchy čelistí. Svou stavbou mohou orální aparáty pulců značně připomínat situaci u mihulí (viz výše). Je to však jen konvergentní podobnost na základě podobného typu stravování. Mihule totiž „škrábe“ maso ze svého hostitele, a i většina pulců se živí škrábáním nárostu vodních rostlin a řas.

5.1. Stavba orálního aparátu pulců

5.1.1. Měkké tkáně

Orální aparát pulců zahrnuje obvykle elipsoidní orální disk, který může mít na laterálních okrajích mělkou rýhu (Obr. 15.). Horní (přední) ret bývá menší než ret spodní (zadní) a jsou navzájem odděleny od povrchu těla. Dále se zde nachází marginální a submarginální papily (Obr. 15.). Každý druh se liší v délce a počtu papil, i v počtu jejich řad (Altig, 2007).

Výraznější, marginální papily, vyskytující se na okrajích orálního disku, lze rozdělit do čtyř základních vzorů. Kompletní (bez mezer), těsně nahloučené, krátké a četné papily pravděpodobně pomáhají při tvorbě těsného spoje mezi orálním diskem a podkladem. Proto je tento vzor nejběžnější u pulců, kteří se uchyťávají na skalnatý povrch v rychle proudících potocích, a méně často je pak pozorováno u forem žijících ve stojatých vodách. Další možnosti představují papily s pouze dorzální = horní (taxonomicky a ekologicky běžné) (Obr. 15.), nebo ventrální = spodní mezerou (ojediněle). Především zástupci čeledi bufonidae a některé druhy z čeledí hylidae, mantellidae, ranidae a rhacophoridae mají typ papil, s dorzální i ventrální mezerou (Altig a McDiarmid, 1999). Submarginální papily se na disku nacházejí laterálně a ventrolaterálně, mezi papilami marginálními a řadami labiálních zubů (Obr. 15.) (Altig, 2006; 2007).



Obr. 15 – Obecné schéma ústního aparátu pulce se vzorcem řad labiálních zubů 2/3. Zkratky: A1, A2 = anteriorní zubní řady; P1, P2, P3 = posteriorní zubní řady; zh = zubní hřeben; mp = marginální papily; sm = submarginální papily; hp = horní a sp = spodní rohovinový povrch čelistí. Upraveno podle Altig a McDiarmid (1999).

5.1.2. Labiální zuby

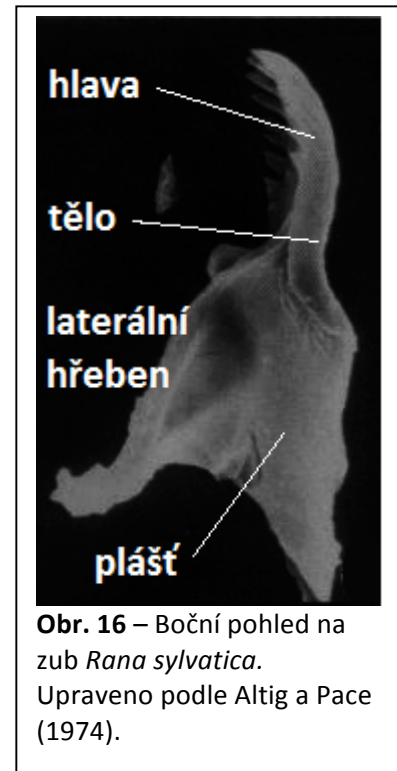
Zuby pulců, nacházející se v příčných řadách na orálním disku (Obr. 15.), jsou čistě keratinózní struktury (Altig a Pace, 1974; Altig, 2006; 2007). Každý zub je však derivátem jen jedné buňky a tvar těchto zubů se mezi jednotlivými taxony liší hlavně ve výčnělcích na špičce zubu (Gosner, 1959; Altig 2007).

Zub se skládá ze tří regionů (Obr. 16.)- 1) z bazálně otevřeného, výrazného, laterálně zploštělého, bazálního pláště s odlišeným vnitřním (orálním) a vnějším profilem; 2) slabě odděleného středního těla; 3) a ze lžícovité, více či méně konvexní hlavy s výčnělky různého množství a orientace (Gosner, 1959; Altig 2007; Candonti a Altig, 2010). Navíc se dá rozeznat takzvaný laterální hřeben (Obr. 16.). Tato struktura je tvořena laterálně zploštělou, orální částí pláště (Altig a Pace, 1974).

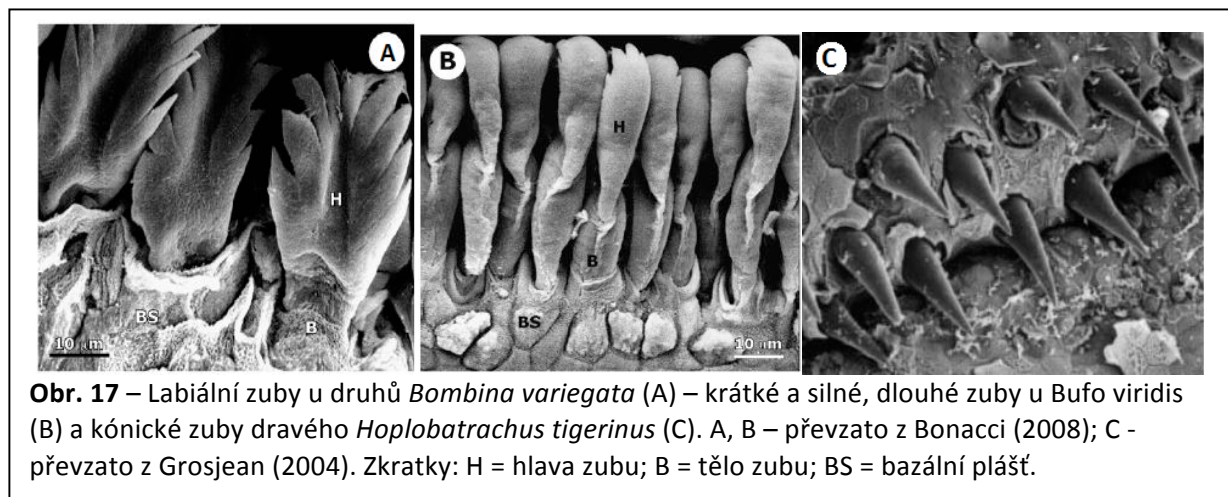
Zuby jsou většinou zahnuté směrem k ústnímu otvoru (Altig, 2007). Samozřejmě se vyskytují i výjimky, např. pulci druhu *Hoplobatrachus tigerinus* mají labiální zuby kónické (Obr. 17. C) (Grosjean a kol., 2004), *Phyllodytes gyrinaethes* naopak rýčovité, těsně přimknuté k dásni, a pulci *Hyla*

leucophyllata a některých druhů z čeledi *Microhylidae* zuby zcela postrádají (Altig, 2006). Jediný druh, u kterého byla zjištěna heterodontie je *Ascaphus truei* (Gosner, 1959; Altig a Pace, 1974).

Keratinizované zuby pulců se vyvíjí z mitoticky aktivních míst v oblasti tzv. zubního hřebene (Obr. 15.) (Altig a McDiarmid, 1999). Zubní hřeben je vlastně nezrohovatělý epitel, který tvoří tkáňovou podporou zubů. Skoro by se dalo říci, že je analogem savčích dásní (Altig, 2007). Jako vše ostatní, i zubní hřebeny vykazují určitou variabilitu, která v sobě jednak nese jistý fylogenetický signál, ale hlavně, jako ostatní adaptace je odvislá od ekologických nároků kladených na pulce - např. u pulců obývajících stojaté vody jsou hřebeny vysoké, mají úzkou bázi a přibližně ve středu mezi sebou, široké valy. Navíc hřebeny vykazují určitou flexibilitu, a tak lze zuby snadno odstranit. Zvířata vod proudících, a zejména formy s přísavkami, mají naopak hřebeny kratší a nahoře zploštělé. Úzké valy leží bezprostředně za následujícím proximálním hřebenem. Obecně ale platí, že se hřebeny stávají kratšími a leží blíže k sobě směrem k distálnímu konci orálního disku. To je velmi výrazné především u zvířat s mnoha řadami zubů (Altig a McDiarmid, 1999). Počet řad zubů může být od nuly až po 17 na anteriorní a 21 na posteriorní straně disku. Zubní řady nemusí být vždy celistvé. Výjimkou nebývá mezera v poslední anteriorní (Obr. 15.) ani první posteriorní řadě (Altig, 2007).

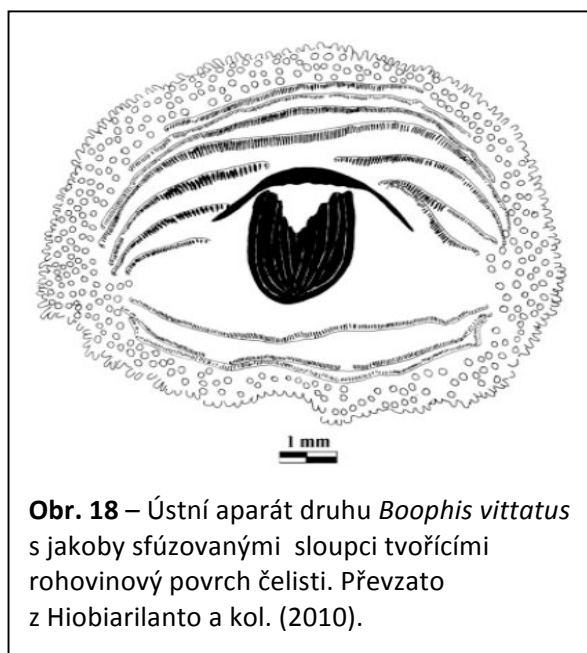


Zuby jsou uloženy v hřebenu v zubních sériích, které jsou tvořeny funkčním zubem a až pěti zuby náhradními nacházejícími se ve sloupci pod sebou. Náhradní zub zasahuje svou špičkou do pláště zubu funkčního, a jakmile dojde k opotřebování horního zubu, je jednoduše nahrazen. Díky průhlednosti tkáně zubního hřebene, můžeme tyto náhradní zuby bez problémů pozorovat (Altig a Pace, 1974; Altig, 2007).

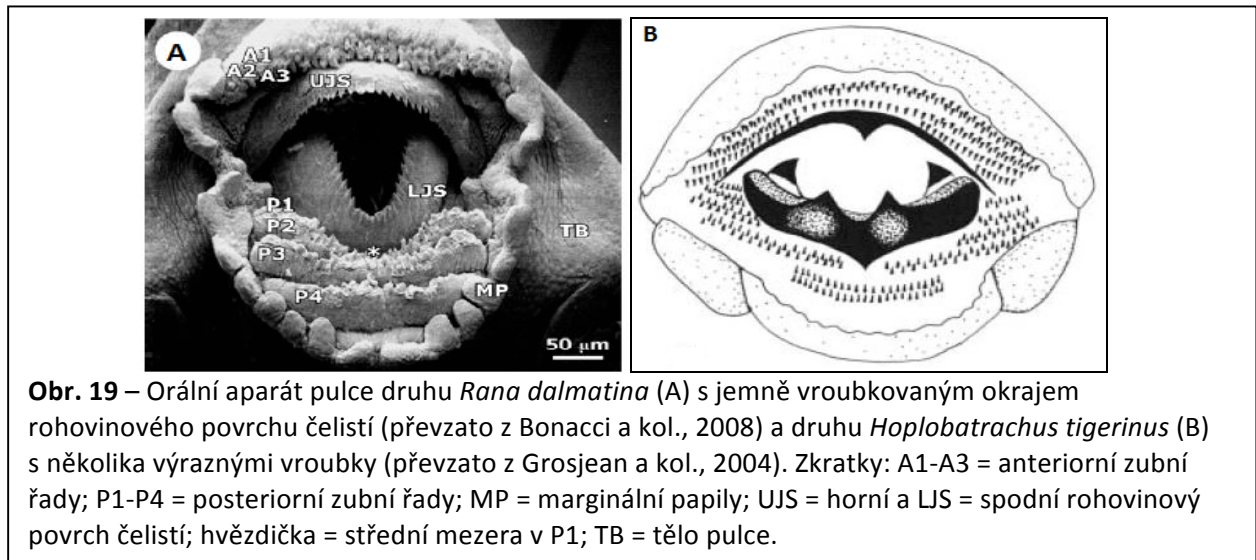


5.1.3. Rohovinový povrch čelistí

Další keratinózní strukturou zahrnutou v ústním aparátu pulců je mnohobuněčný povrch chrupavčitých čelistí (Altig, 2007; Alibardi, 2010), který je neustále obnovován díky spodní vrstvě mitoticky aktivních buněk. Zde vzniklé nové buňky po cestě k povrchu postupně keratinizují (Altig a McDiarmid, 1999; Altig, 2007). Strukturou povrchů, ale hlavně jejich tvarem u různých čeledí se zabýval Altig a McDiarmid (1999), oproti jiným autorům zaměřujících se pouze na několik druhů. Rohovinový povrch bývá hladký, někdy se na něm však mohou vyskytnout brázdy (alespoň v jeho bazální části) či zdrsnění proximálně k řezným hranám na horní čelisti (*Hyla pictipes*). Mezi formami s přísavkovými ústy rohovinový povrch vypadá, jako by byl složen z několika sérií sfúzovaných sloupců buněk (někteří *Boophis* – Obr. 18.) (Hiobiarilanto a kol., 2010).



Typické řezné hrany povrchu jsou vroubkované (Obr. 19. A). Různé druhy se však liší hustotou vroubků, jejich orientací (mediální jsou rovné, laterální šikmé), tvarem (nízké se širokou bází nebo vysoké s bází úzkou), velikostí a přítomností (mohou chybět). Nejtypičtější jsou hrany se 30 - 50 vroubků na milimetr. Vyšší počty jsou známy u druhů tekoucích vod, nižší, jen 5 – 8 zářezů na milimetr, se vyskytují pouze v několika případech (někteří *Amolops* a *Boophis*). Velikost vroubků se obvykle stupňuje od středu pláště, kde jsou největší, k nejmenším na laterálních koncích. Atypické velikosti vroubků, s 1 – 3 zvětšenými oproti okolním, můžeme najít jen na horním (*Plectrohyla ixil*, *P. matudai*) nebo na obou rohovinových površích čelistí (*Leptodactylodon ventrimarmoratus*) (Obr. 19. B). Vroubky mohou také chybět, a to buď jen přechodně v určité fázi vývoje, nebo po celý larvální život (*Mantidactylus lugubris*).



Povrchy horní a spodní čelisti mívají obvykle stejnou velikost. Jejich tvar je poměrně těžké popsat, kvůli jejich kompletnímu zakřivení a trajektorii protilehlých řezných hran, které se mění ohromně mezi taxony, leč žádné nebyly popsány příliš detailně. Nejobvyklejší povrch horní čelisti bývá jednoduše obloukovitý, avšak u některých forem s přísavkovými ústy zaujímá tvar písmene M. Naopak povrch spodní čelisti je nejčastěji tvaru písmene V, ale do písmene U tvarovaný spodní povrch druhu *Ascaphus* je minimální vzhledem k velkému, zploštělému, povrchu hornímu. Některé druhy, *Amolops* (*Ranidae*), *Ansonia* (*Bufo* *subgenus* *Bufo*) a *Litoria* (*Hylidae*), mají horní nebo oba povrchy ve středu rozděleny.

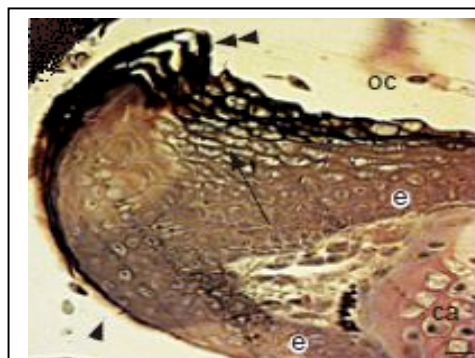
Rohovinové povrchy čelistí se obvykle vyskytují ve společnosti labiálních zubů orálního disku, mohou se však vyskytovat i samostatně. Například u skupin *Hylidae*: *Hyla leucophyllata*, *Ranidae*: *Occidozyga* sp., a *Microhylidae*: *Scaphiophryne* sp.. Jen u pár výjimek (někteří

Heleophryne) to bývá naopak – že totiž pulci mají keratinózní zuby, ale postrádají horní, nebo oba rohovinové povrchy (Altig a McDiarmid, 1999).

5.1.4. Keratinizace rohovinového povrchu čelistí

Procesem keratinizace rohovinového povrchu se zabýval například Alibardi (2010), který si rozdělil tuto strukturu na tři regiony podle polohy na čelistech a pozoroval jejich vývoj (Obr. 20.). Je zajímavé, že každá ze tří částí se odlišuje ve vzniku a stavbě horní vrstvy korneocytů. Pozoroval také, že pigmentace rohovinového povrchu není způsobená melanozomy, ale ukládáním tmavších proteinů nad keratin.

První, nejtvrďší částí je oblast řezných hran, která je tvořena kuželovitými korneocyty nahloučenými těsně za sebou. V nich se keratin s vysokou elektronovou hustotou ukládá především podél



Obr. 20 – Detail podélného řezu dorzálním rohovinový povrchem pulce. Dvojitá šipka ukazuje buňky centrálního kužele; jednoduchá šipka nezralé buňky orální strany a hlava šipky vnější, labiální pláště. Oc = orální dutina; e = epidermis. Převzato z Alibardi (2010).

plazmatické membrány, kde je také jeho nejsilnější vrstva. Tyto buňky musí být odolné vůči oděru, protože právě hrany slouží k kuskování a oškrabávání vodních rostlin pulci. Labiální povrch je jen o něco měkčí strukturou. Ve zralé buňce zůstává uložena centrální cytoplazma a silná vrstva zrohovatělé buněčné membrány. Proto se buňky labiální oblasti pláště jeví poněkud zrnitěji než ty kuželovité. Posledním, nejměkčím okrskem rohovinového povrchu je jeho orální strana. V konečné fázi zrání těchto buněk většina cytoplazmy zaniká a zůstanou v nich pouze zvětšené vezikuly, které také obklopuje zrohovatělá buněčná membrána.

Během procesu keratinizace se, u všech obratlovců, do buněk ukládají dvě hlavní složky - střední keratinová filamenta a KAPs = Keratin-associated Proteins. A právě KAPs hrají velmi významnou roli ve formování a tvrdosti rohovinových struktur obratlovců. Přesným molekulárním složením KAPs, především v epidermis, se zabývá ve svých článcích např. Alibardi (2002; 2009). To je však již mimo rámec této práce.

Obecné histochemické reakce ukázaly vysoký počet SH skupin v keratinu kuželových buněk. V hustém rohovinovém materiálu je také nedostatek typického α -keratinu šířky 8 – 10 nm, nahrazen filamenty o tloušťce 3 – 5 nm, jinak řečeno β -keratinem. V buňkách labiálního a

orálního pláště není ukládání aKAPs tak výrazné. Probíhá společně s vmezeřováním ribozómů do amorfního keratinu a kromě aKAPs jsou, hlavně v orálním epitelu, přítomny i lipoproteiny z vezikulů Alibardi (2010).

5.2. Evoluční význam pulčích rohovinových struktur

Morfologie ústního aparátu může na jedné straně představovat druhově specifický identifikační znak, rozlišující jednotlivé druhy, dokonce i rody pulců (kupř. Starret, 1960; Hiobiarilanto a kol., 2010), na straně druhé však i poměrně fylogeneticky vzdálené linie mohou mít ústní ústrojí velice podobné. Proto není divu, že vznikla spousta prací zaměřujících se právě na jeho vývoj a morfologii a výsledky pozorování pak byly porovnávány mezi různými druhy. V zásadě existují dva hlavní pohledy na důvod podobností a odlišností ve stavbě ústního aparátu jednotlivých druhů pulců. Pohled ekologický říká, že ústní morfologie souvisí hlavně s přijímaným druhem potravy (např. Khan a Mufti, 1994; Vences a kol., 2002). Jiný názor (kupř. Gosner, 1959; Altig, 2006; Bonacci a kol., 2008; Candiotti a kol., 2011) se přiklání spíše k významu fylogenetickému. Někteří autoři, kupř. Grosjean a kol. (2004), však považují oba pohledy za neoddělitelné.

Candotti a Altig (2010) se pokusili po prozkoumání 108 různých druhů pulců určit, který výše uvedený přístup k porovnávání morfologických změn, týkajících se především obecného zakřivení zubu, úhlu mezi zubní bází a vrcholkem, tvaru hlavy a šířky pláště, je statisticky významnější. Podle nich rozdělení podle fylogeneze vysvětluje 35 % z celkové zubní podobnosti, zatímco při rozdělení pulců do ekomorfologických gild byly nezávislé na fylogenezi pouze skupiny živící se nasáváním (suctorial) a žijící v tekoucích vodách, s významností 7 %. Společná variance fylogeneze a ekomorfologických gild je také 7 %. Zbýlých 51 % nebylo možno vysvětlit ani jednou z předchozích možností.

Obecným vývojem a původem labiálních zubů se zabýval Altig (2006). Ve své práci zaujímá názor, že původní zuby byly nejspíše krátké, se slabě lopatovitou hlavou s malými nebo chybějícími výčnělky. Neexistovala zubní výměna a ani uložení do řádků. Naopak zuby byly pevně uchyceny na každém rtu disku a zahnuty směrem k ústům. Původně totiž měly stabilizační a přichycovací funkci, zatím co o škrábání řasového nárostu se staral rohovinový plášť čelistí. Zuby byly postupně přemístěny do příčných řad, protože to umožňuje jejich efektivnější využití a navíc tím míň zatěžují svaly ústního aparátu. Hřebeny patrně vznikly kvůli potřebě různé flexibility závislé na rozdílných habitatech, ale především schopnost měnit pozici zubů v různých částech disku vzhledem k podkladu zvýšilo funkčnost zubů při škrábání řas.

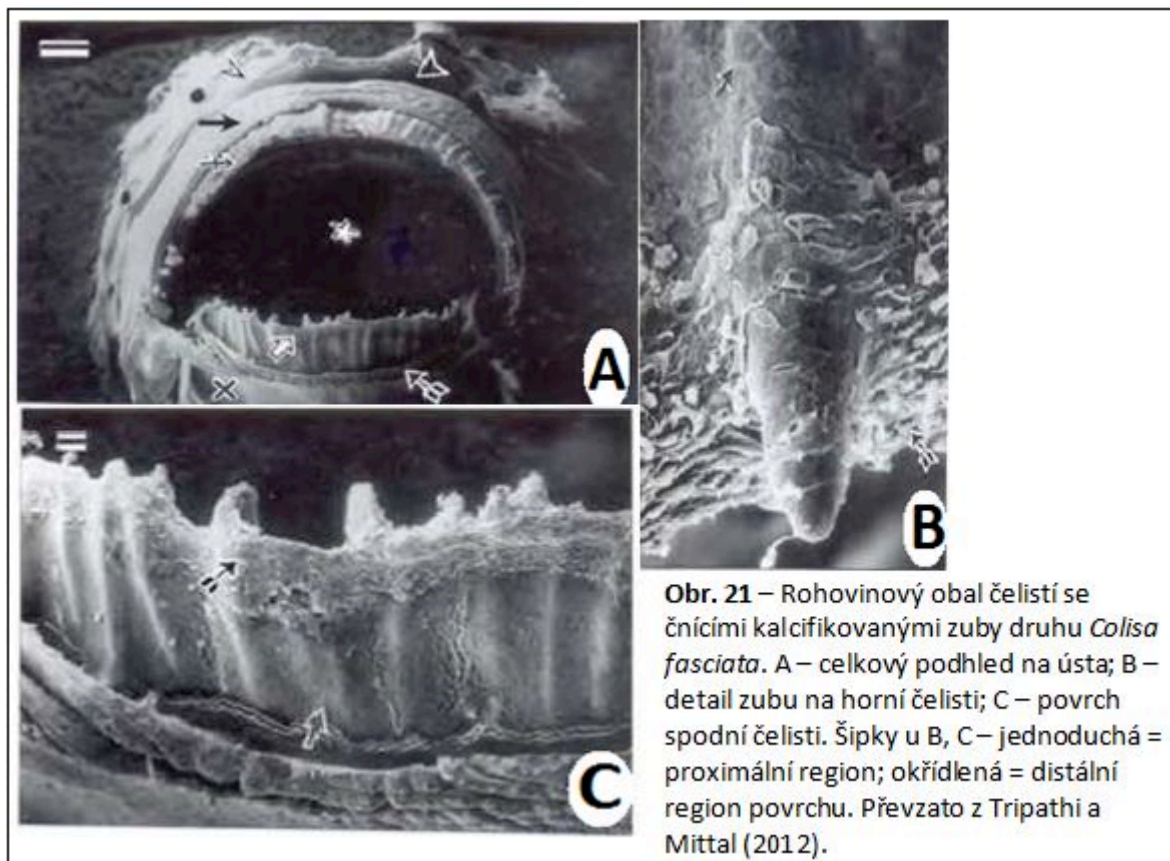
6. Ryby a jejich keratinózní struktury

Přestože jsou tyto vodní živočichové nejpočetnější skupinou obratlovců, nikdy u nich nedošlo ke kompletní ztrátě kalcifikovaných zubů. Zuby se mohou vyskytovat jak v orální dutině, tak ve fáryngu na žaberních obloucích (jako tzv. požerákové zuby). Díky množství adaptací na potravní i prostorové zdroje se však u ryb vyvinuly i jiné pomocné struktury v oblasti úst – např. vousky, adhezivní orgány, či rohovinový povrch čelistí. Rohovinový povrch může být hladký nebo speciálně u nadřádu *Ostariophys* drsný, díky výběžkům povrchových buněk – tzv. unculi.

6.1. Rohovinový povrch čelistí

Čelisti ryb mohou mít, podobně jako například pulci žab, nebo v podstatě i ptáci a želvy, rohovinový povrch. Tento povrch se však nevyskytuje u celých nadřádů, ale spíše u jednotlivých druhů. K podrobnému zmapování výskytu rohovinového povrchu by proto byla potřeba projít celosvětový atlas ryb, což vzhledem k počtu jejích druhů není v rámci této práce.

Proto jsem využila hlavně práci Tripathi a Mittal (2012) a stavbu rohovinového povrchu čelistí popíši na příkladu všežravé ryby *Colisa fasciata* (*Perciformes*), žijící v různých druzích znečištěných vod.



Na obou čelistech této ryby se nachází celkem nevýrazné rty, zato však výrazné zrohovatělé povrchy čelistí (Obr. 21. A, C), které se v distálním regionu přeměnily v ostrou, střížnou hranu. V této struktuře se dokonce vyskytují kuželovité zuby, vyčnívající nad povrch (Obr. 21. A, B, C). Keratinizovaný epitel čelistí je dlaždicový, tvořen různě velkými a tvarovanými buňkami s odlišnou stavbou povrchu, specifickou pro daný region, avšak zcela na něm chybí buňky mukózní a chuťové pohárky (Obr. 21. B, C). V proximální oblasti jsou jednotlivé buňky rozděleny mělkými příkopy nebo dvojitou řadou mikrohřebenů a na jejich povrchu jsou nízké, malé a špatně rozlišitelné mikrohřebený. Epiteliální buňky distální oblasti jsou rovněž ohraničeny dvěma řadami blízko položených mikrohřebenů, avšak ty mohou mít na povrchu různé vzory - vlnky, větvení atd. Dochází zde dokonce k jejich zkracování až do podoby jednotlivých teček oddělených širokými mezerami. Právě v distálním regionu povrchu byly pozorovány buňky na vyvýšeninách, nejspíše v procesu obměny.

6.2. Unculi

Unculus (pl. unculi, pro účely této práce skloňováno podle vz. hrad), tedy jednobuněčné, převážně zahnuté struktury, nacházející se především v oblasti párových ploutví a úst, definoval pouze pro nadřád *Ostariophysii* Roberts (1982). Unculus je vlastně výběžek na volném povrchu epiteliální, rohovinové buňky (Tripathi a Mittal, 2010; 2012) mající množství tvarů a velikostí, lišících se podle umístění na těle a druhu ryby. Obvyklé rozmezí jejich výšek je 2 – 30 μm a mohou být masivní, jemné, okrouhlé, hemisférické, polygonální, kónické, hákovité, listovité, jazykovité, nebo uťaté (Roberts, 1982).

6.2.1. Keratin unculů

Keratinózní podstata unculů a přilehlé, spodní vrstvy epidermis byla potvrzena histochemicky a fluorescentně např. u ryb *Garra lamta* a *Puntius sophore* (Pinky a kol., 2004; Tripathi a Mittal, 2010). Z barvení provedených na zjištění různých glykoproteinů například vyšlo, že se zde vyskytuje jen malé množství funkčních skupin glykoproteinů s oxidovatelnými vicinálními dioly. Horní vrstva epitelu s unculy byla také analyzována na přítomnost určitých proteinů. Z testů vyšlo, že buňky obsahují velké množství obecných proteinů a velký výskyt špatně ohraničeného cysteinu vázaného na -SH skupinu, který se vyskytuje i u obojživelníků (Alibardi, 2010), u sliznatek ale pouze v nezralých buňkách zubu (Dawson, 1969). Tento druh cysteinu se dále

nemění na -SS skupinu vázaný, a proto se řetězce keratinu špatně spojují. Avšak v tenké vrstvě na periférii uncul se cystein -SS vyskytuje. Tím jim zaručuje tvrdost, podobně jako u enamelu v zubech. Dále pak zpevnění keratinu zajišťuje i tryptofan, tyrosin a jiné proteiny vázané na NH₂ skupinu. Nakonec i silná fluorescence unculů s různými fluorochromy použitými při výzkumu bez předchozí ošetření DNAzou a RNAzou ukazuje na jejich keratinózní podstatu. Rybí cytokeratiny však mají vysokou tkáňovou specifitu a zatím neexistuje přímý důkaz o tom, že by jejich vývoj souvisel s vývojem keratinu u vyšších obratlovců. To buď jen potvrzuje dlouhou evoluční historii od rozdělení rybí a tetrapodí linie, nebo specifický typ keratinu uzpůsobený na vodní prostředí. To by však musel stejné složení vykazovat např. i keratin mihulí a sliznatek (viz výše) – také primárně vodních obratlovců. Bohužel se na takovéto bližší srovnání ještě nikdo pořádně nezaměřil.

6.2.2. Výskyt unculů

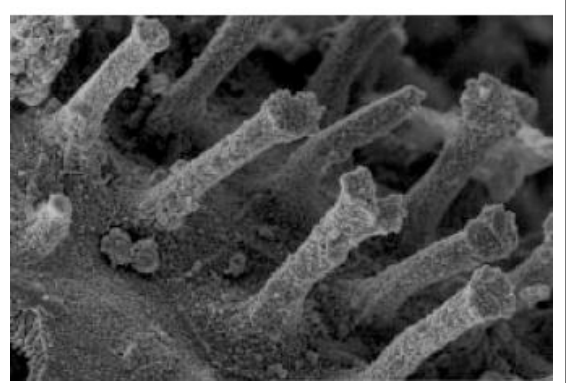
Unculy v oblasti úst můžeme najít pouze u zástupců nadřádu *Ostariophysii* a to z řádů *Cypriniformes*, *Suliformes*, *Chaniformes*. Zástupci řádu *Characiformes* také mají uncule, ale pouze na párových ploutvích (Roberts, 1982; Tripathi a Mittal, 2010) a proto se tímto řádem nebudu dále zabývat.

V řádu *Chaniformes* se uncule vyskytují většinou na rtech ryb, ale kupř. u druhu *Phractolaemus ansorgei* jsou jednobuněčné výběžky podobné unculům nacházeny i na žaberních tyčinkách (Roberts, 1982).

Dalším, celosvětově rozšířeným řádem s unculy, je *Siluriformes*. Přestože jeho zástupci mají plně vyvinuté keratinózní zuby, mnohdy i specializovaných tvarů pro efektivní získání potravy (Geenckx a kol., 2007), unculy lze nalézt u těchto čeledí: *Amphiliidae*, *Sisoridae*, *Akysidae*, *Mochokidae*, *Aspredinidae* a *Loricariidae*, ale z převážné většiny se nachází pouze na párových ploutvích, adhezivních orgánech, kůži hlavy a těla či na speciálních břišních destičkách (Roberts, 1982). Popis všech těchto struktur je však nad rámec této práce.

Unculy, mimo jiné v rámci ústní oblasti, u sumce *Pseudocheneis sulcatus* (*Sisoridae*) popsal jako řady vysokých, kuželovitých výběžků se širokou základnou, na povrchu zcela keratinizované epidermis rtů jejichž sousední buňky jsou odděleny viditelnou drážkou, Joshi a kol. (2012).

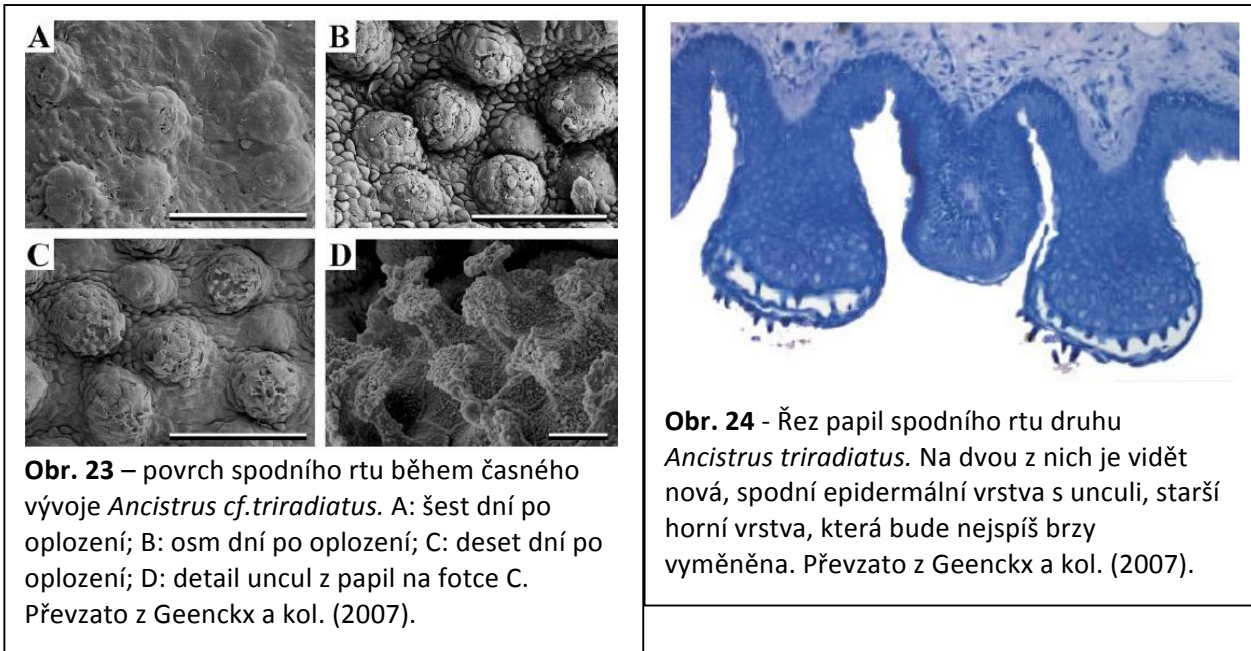
Rozborem druhé čeledi, žijící v tropech Jižní Ameriky a mající ústní unculy, se ve své práci zabývá Geenckx a kol. (2007). Všichni *Loricariidae* mají spodní, přísavkovitá ústa a živí se nárosty řas. Na obou čelistech mají zuby, každý druh trochu jiný tvar a strukturu. Navíc se však na labiálních papilách spodního rtu, výjimečně i horního, vyskytují keratinózní unculi. Tyto dvě struktury se pravděpodobně doplňují v škrábání řasového nárostu, a jejich morfologie slouží jako určovací znak jednotlivých druhů a rodů. Důkazem toho, že unculi neslouží pouze k adhezi či ochraně ústního epitelu je druh *Rineloricaria parva*. U něj totiž nebyly unculi na papilách vůbec pozorovány, ale evidentně mu to žádné problémy s udržením či oděrem nezpůsobuje.



Obr. 22 – štíhlé unculi se zploštělou špičkou *Pterygoplichthys lituratus*. Převzato z Geenckx a kol. (2007).

Měření a počítání náhodně vybraných pěti papil a deseti unculů bylo prováděno pomocí skenovacího mikroskopu u sedmi druhů ryb z této čeledi. Tak bylo zjištěno, že každý druh má jinak velké, tvarované a početné unculy na papilách, a pokud se na papile vyskytují společně s chuťovými pohárky, pak jsou unculi umístěny rostrálně. Druhy se štíhlými unculy (*Ancistrus triradiatus* (Obr. 23. D), *Farlowella acus*) nebo naopak až příliš zploštělými (*Panaque nigrolineatus*, *Otocinclus vestitus*), jimi mívají pokryty celé papily a jejich počty činí 40 – 80 uncul, u *Panaque* můžou však dosahovat i několika stovek na jediné papile. Zbytek zkoumaných ryb (*Pterygoplichthys lituratus* (Obr. 22.), *Sturisoma aureum*) má rovné, na vrcholku zploštělé unculy s výškou 8 - 16 μm a v počtech 20 – 50 uncul na papilu.

U druhu *Ancistrus triradiatus* byl také pozorován vývoj unculů během embryogeneze. Nejdříve, již první den po vykulení, byly pozorovány rudimentární papily (Obr. 23. A). Ve třetím dni došlo k výměně epidermis (Obr. 23. B) a první unculi se na papilách ukázaly pět dní po vykulení (Obr. 23. C, D). V této době také dochází k úplné resorpci žloutkového vaku a objevují se kalcifikované zuby s již dobře vyvinutými špičkami. Na mikroskopických fotografiích papil u většiny druhů bylo také možno pozorovat odlupování horní vrstvy buněk i s unculy (Obr. 24.).



Cypriniformes (máloostní) zcela postrádají orální dentici již zhruba 50 miliónů let (Stock a kol., 2006) a kalcifikované zuby se u nich vyskytují pouze ve fáryngu, na žaberních obloucích, jako tzv. požerákové zuby. Příčinami této situace se mimo jiné zabýval i Stock a kol. (2006). Ten navrhl, že za ztrátu orální dentice může nepřítomnost exprese důležitých *Dlx2* genů, která ovšem musela být něčím zapříčiněna. U zebřičky (*D. rerio*) i kontrolní ozubené tetry *Astyanax* je exprese *Dlx2* závislá na předchozí expresi genů *Fgf*. Pokud by tudíž došlo u kaprovitých z jakéhokoliv důvodu k zablokování *Fgf* genů v orálním epitel, pak by neproběhly další reakce důležité pro indukci vzniku zubů.

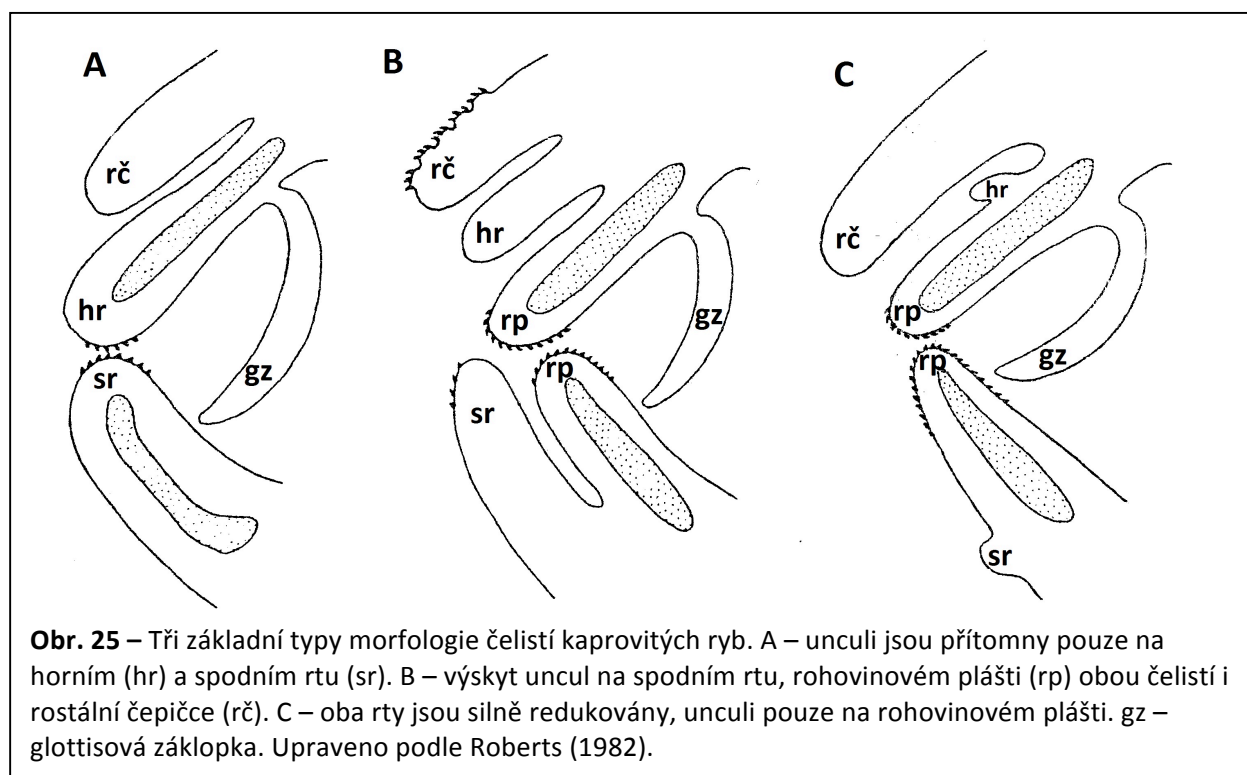
Cypriniformes by mohly představovat ideální skupinu obratlovců, u kterých by mohlo dojít k návratu orální dentice, neboť geny, důležité pro tvorbu zubů jistě přítomny jsou (srv. přítomnost požerákových zubů). Slavné tzv. Dollovo pravidlo však říká, že evoluce se nevrací k již jednou ztraceným strukturám a pokud ano, nemohou vzniknout zcela stejně (kupř. Wiens, 2011). Snad možná proto si máloostní příjem potravy usnadnili zrohovatělými unculy, které rybám pomáhají při nabírání bahna a hledání potravy v něm, nebo přímo slouží k jejímu zpracování (Tripathi a Mittal, 2012). Pro svou odolnost však keratinózní povrch s unculy může sloužit i jako mechanická ochrana před oděrem měkkých tkání, ostatně jak je tomu v podobě různých šupinek na povrchu kůže mnoha jiných živočichů.

Řádem *Cypriniformes* se podrobně zabýval Roberts (1982), který pro něj vypracoval systém tří typů morfologie úst (Obr. 25.) rozdělených podle následujících kritérií: 1) stupeň vývoje a specializace rostrální čepičky; 2) přítomnost či nikoliv rohovinového povrchu na

čelistech v kombinaci s přítomností nebo jako nahrazení rtů; 3) stupeň vývoje a specializace rtů; 4) forma a distribuce uncul na rostrální čepičce, rtech a rohovinovém povrchu čelistí.

Tzv. rostrální čepička se nachází nad horním rtem pravděpodobně všech kaprovitých ryb. V mnoha případech je tato struktura malá a nehraje roli (Obr. 25. A), zato v jiných může být prodloužena a částečně nebo kompletně překrývat horní ret. Zde zastává důležitou roli v oškrabávání řasového nárostu (Obr. 25. B). U mnoha druhů se vyskytují relativně jednoduché rty s unculy, stejně jako rohovinový plášť pokrývající kosti čelistí (Obr. 25. B). U některých druhů dochází k redukci rtů, jejichž funkce jsou plně nahrazeny čepičkou a pláštěm (Obr. 25. C).

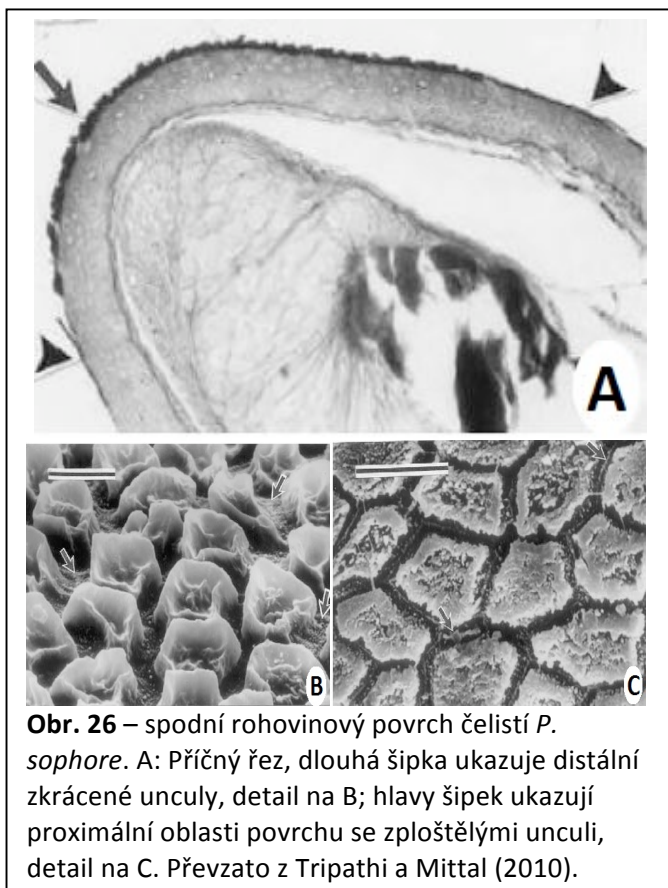
Nejprozkoumanější čeledí je určitě *Cyprinidae* (kaprovití), díky vysoké specializaci a světovému rozšíření jednotlivých druhů. Některé rody (například *Campostoma*, *Nocomis*, *Semotilus*) postrádají rohovinové obaly čelistí a unculy mají pouze na rtech (Obr. 25. A). Jiný druh, *Osteocheilus sp.*, má naopak rohovinové povrchy čelistí široké. Mezi jednotlivými rody je však velká početní, tvarová i výšková (vysoké přes 26 μm) rozmanitost unculů na rtech i retních záhybech (Roberts, 1982).



Jednou z nejpoužívanějších ryb, co se výzkumu unculů týče, je vysokohorská *Garra lamta*. Oba rty jsou nenápadné, na rozdíl od rohovinového povrchu čelistí, a protože žije v rychle proudících potocích, má na ventrálním adhezivním disku i rostrálním víčku hákovité unculy (Obr. 25. B) (Pinky a kol., 2004; Tripathi a Mittal, 2012). Rohovinový povrch čelistí je posetý

rovnoběžnými řadami vysokých, komolých unculů, které jsou modifikovaným volným povrchem epiteliální buňky. Tvar unculu může, pro svou centrální prohlubeň a ostré okrajové hrany, připomínat zub (Tripathi a Mittal, 2012). Podobně vypadající ústa mají i jiné himalájské rybky čeledi *Psilorhynchidae*. Mají dobře vyvinutou rostrální čepičku, rty pokrývají úzké, hákovité a až 30 μm velké unculi a naopak rohovinový plášť pouze unculi šupinovitě (Roberts, 1982).

Puntius sophore je, narozdíl od *Garra lamta*, obyvatel mělkých, znečištěných vod (Tripathi a Mittal, 2012). Oba jeho rty přecházejí směrem do úst v epiteliální rohovinový povrch čelistí, od kterého je dělí pouze mělká brázda. Tento povrch se skládá z pěti až osmi vrstev buněk a jeho tloušťka na horní čelisti je průměrně $24,31 \pm 7,08 \mu\text{m}$, zatímco na spodní jen $19,72 \pm 5,69 \mu\text{m}$. Směrem k povrchu se buňky stlačují a postrádají mezibuněčné prostory. Na volné straně pak horní vrstva epiteliálních buněk vytváří zkrácené, mnohoúhelníkové a podobně velké unculy (Tripathi a Mittal, 2010). Tvary i rozmístěním se unculi



Obr. 26 – spodní rohovinový povrch čelistí *P. sophore*. A: Příčný řez, dlouhá šipka ukazuje distální zkrácené unculy, detail na B; hlavy šipek ukazují proximální oblasti povrchu se zploštělými unculi, detail na C. Převzato z Tripathi a Mittal (2010).

podobají druhu *Neomacheilus botia*, zástupce z jiné čeledi, ale se stejnými ekologickými nároky. Unculi *P. sophore* jsou však trochu méně uspořádány a střední část unculů je širší (Tripathi a Mittal, 2012). V proximálních oblastech čelistí (Obr. 26. A) se unculi zplošťují a zdrsňuje se jim povrch. To je dáno především mikrokly, které ve středu buňky tvoří různé obrazce, postupně ale splývají, až vytvoří jednolitý okraj (Obr. 26. C). Unculi v distální části (Obr. 26. A) mají vysoké, ostré okraje a středovou prohlubeň s mikrohřebeny (Obr. 26. B), takže mohou připomínat savčí stoličky. Všechny buňky rohovinového povrchu obou čelistí jsou pak navzájem odděleny řadou mikrohřebenů (Tripathi a Mittal, 2010; 2012).

Unculi se vyskytují i u naší nejznámější ryby – kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Na nenápadném rohovinovém povrchu čelistí jsou ploché polygonální unculi s mělkou centrální prohlubní, lemovanou úzkou vyvýšeninou. Celý povrch se pak jeví poněkud drsně. Nachází se na něm totiž mikrohřebeny, které jsou od sebe odděleny výraznými mezerami ale zároveň tvoří síťový vzor. Jednotlivé epiteliální buňky jsou rovněž rozděleny výraznou mezerou mezi dvěma řadami mikrohřebenů (Tripathi a Mittal, 2012).

U ekonomicky významných ryb bych ještě zůstala, a to poznámkou o *Cirrhinus mrigala*, jedné z nejpěstovanějších ryb ze záplavové Indo-Gangšské oblasti. U ní se unculi nachází pouze na rohovinovém povrchu horní čelisti, směrem do ústní dutiny a jsou uspořádány v rovnoběžných, diagonálních řadách. Na povrchu mají drobné, spojené výrůstky, které směrem ke sníženému středu unculů také zmenšují svou výšku o proti výčnělkům na okrajích (Yashpal a kol., 2009).

7. Keratinózní kostice velryb

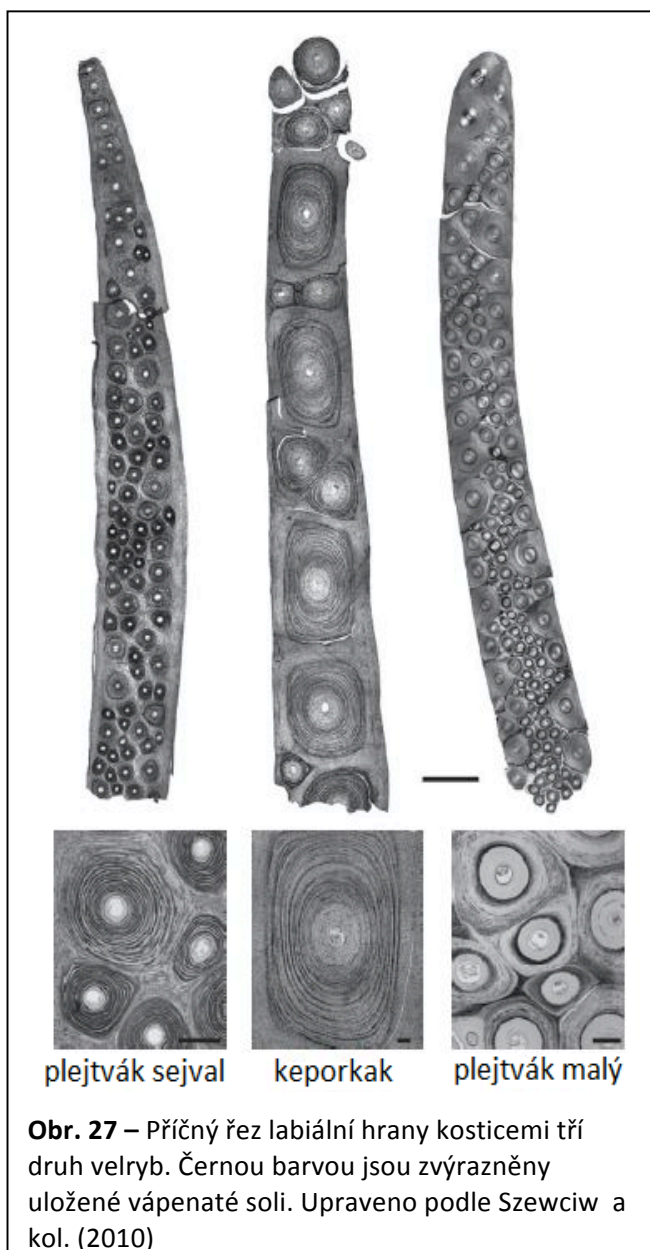
Keratinózní struktury zastupující funkci zubů se vyskytují i u největších žijících savců – velryb podřádu koticovci (*Mysticeti*) (Obr. 1.). Jak již z českého názvu vyplývá, mají koticovci vyvinut speciální filtrační aparát složený z kotic, které dorůstají po celý život velryby.

7.1. Stavba kotic

Kostice, stejně jako ostatní keratinózní struktury savců, jsou tvořeny intermediálními filamenti složenými z α -keratinu (Bragulla a Homberger, 2009). Jak se ale stane, že tato vlákna, původně měkká a roztažná ve vodném prostředí živých buněk, tvoří na povrchu pevné struktury? Jedna možnost je vysoušení filament na vzduchu s doprovodným obklopením sítě z keratinové matrix (Szewciw a kol., 2010). Jak může být tento proces použit u velryb, které tráví celý život ve vodě, navrhl Szewciw a kol. (2010) jako jedno možné vysvětlení ukládání vápenatých solí mezi vlákna α -keratinu.

Velrybí filtrační aparát se skládá z jednotlivých koticových plátů, které mají na hraně směřující do ústní dutiny jakési štětiny. Právě tyto tvoří filtrační síť, do které se zachytává potrava (např. Davit-Béal a kol., 2009; Gaisler a Zima, 2007; Szewciw a kol., 2010). Asi tedy nepřekvapí, že charakter těchto štětín přesně odpovídá přijímané potravě – čím je tato menší, tím jemnější jsou štětiny.

Na příčném průřezu plátu jsou vidět mnohobuněčné rohovinové tubuly i intertubulární rohovinové buňky. Kromě α -keratinu obsahují i vápenité soli a fosfor, a to v takovém molárním poměru, který odpovídá hydroxyapatitu, stejně jako v kostech. V kostech se však hydroxyapatit ukládá mimobuněčně, zatímco v kosticích uvnitř buněk. Největší koncentrace krystalů soli v je v buňkách tubulární rohoviny (tvořící tzv. tubulární lamely) na straně přivrácené ke středu tubulu. Střed, stejně jako několik následujících řad rohovinových buněk za lamelou, neobsahuje soli. Tím dochází k vytvoření charakteristických soustředných kruhů, jejichž počet stoupá směrem ke středu tubulu (například keporkak a plejtvák sejval) (Obr. 27.). Toto však, stejně jako velikost tubulů, je variabilní mezi jednotlivými druhy velryb (plejtvák malý má často ve vnitřní kůře tubulu jen jeden nebo dva hrubé kalcifikované pruhy z tubulárních lamel) (Obr. 27.). Podobně vypadá i kosticová štětina. Ta je ovšem tvořena jen jedním dutým tubulem (Szewciw a kol., 2010).



Obr. 27 – Příčný řez labiální hrany kosticemi tří druh velryb. Černou barvou jsou zvýrazněny uložené vápenaté soli. Upraveno podle Szewciw a kol. (2010)

Podobně vypadá i kosticová štětina. Ta je ovšem tvořena jen jedním dutým tubulem (Szewciw a kol., 2010).

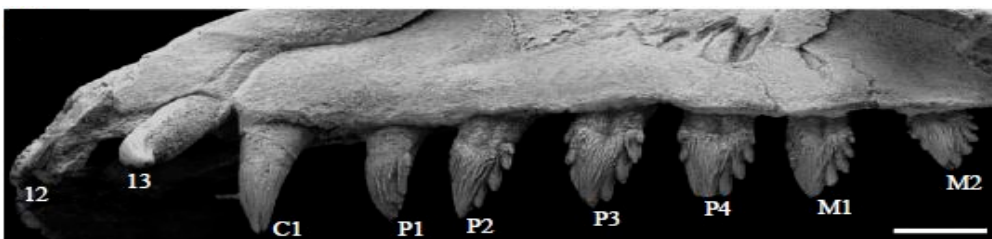
Změřením pružnosti v ohybu a tahového napětí filtračních štětín u tří druhů s různě vysokým obsahem vápenatých solí v kosticové rohovině (plejtvák sejval nejvyšší, keporkak střední a plejtvák malý nejnižší) bylo zjištěno, že zpevnění kalcifikací hraje roli pouze při ohybu, zatímco v tahu všechny tři vzorky vykazovaly přibližně stejné výsledky. To je logické, uváží-li se hydrodynamické síly, střety s kořistí či oděr o jazyk, které štětiny nijak nenatahují, ale spíše ohýbají. A právě kvůli abrazi se soli neukládají na povrch - kde by sice měly největší účinnost zpevnění, ale oděrem v jednom bodu by došlo ke zlomení a brzké abrazi, tím pádem

nefunkčnosti, jemného konce. U vnořených kruhů toto nehrozí, protože posilují štětinu po celé její délce, i když je svrchní keratin odírán. Proč ale zvyšovat koncentraci vápníku, když lze jednoduše zvýšit průměr tubulu a tuhost bude stejná? Větší rozměry štětin by totiž nevytvořily dostatečně malé síto tak, aby se na něm zachytila potrava (Szewciw a kol., 2010).

Distribuce solí se neliší pouze v tubulární (viz výše), ale i intertubulární rohovině jednotlivých druhů. U keporkaka a plejtváka sejvala je bez vápenitých solí, zatímco plejtvák malý má intertubulární rohovinu kalcifikovanou (Obr. 27.). Plejtvák malý se totiž živí rybami a krilem, proto nepotřebuje štětiny jemné, ale spíše větší a pevnější. Ať je však intertubulární i tubulární rohovina kalcifikovaná či nikoli, soudí se, že právě napětí vzniklé náhlým rozhraním v tuhosti materiálů usnadňuje oddělování nových štětin (Szewciw a kol., 2010).

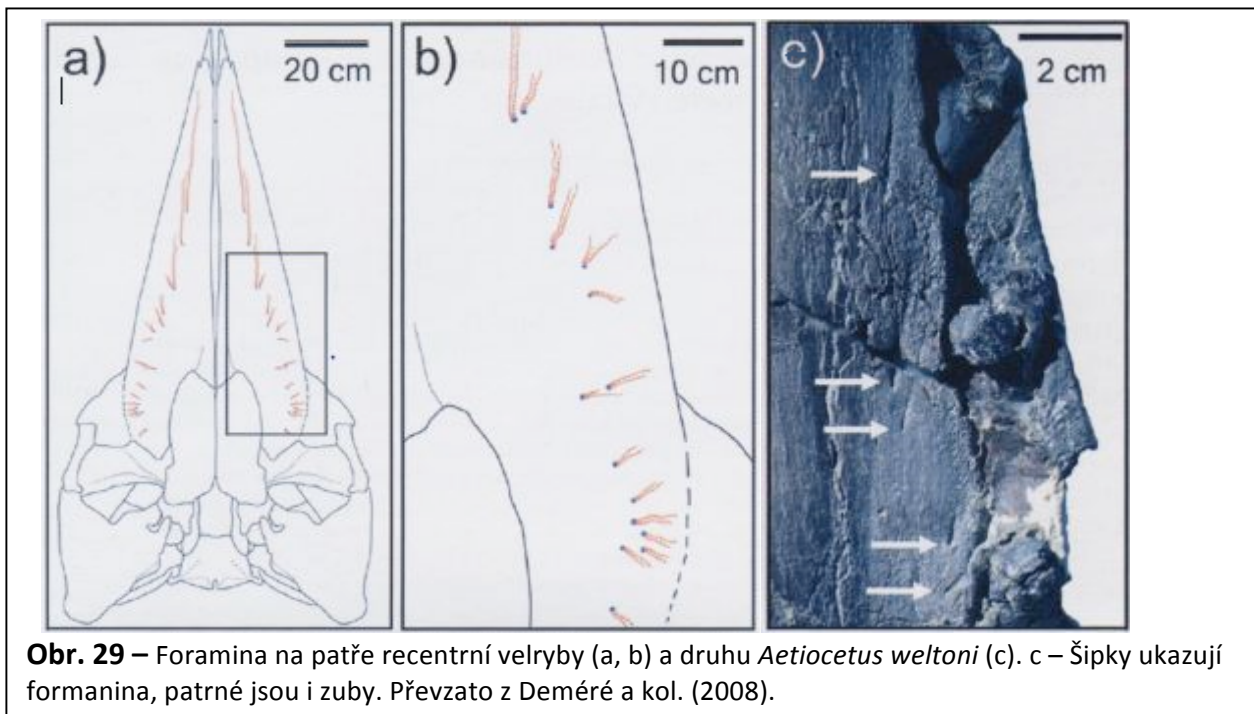
7.2. Evoluce kostic

Moderní kytovci vznikli z eocénních prakytovců (*Archaeoceti*) – velkých, mořských predátorů s plně vyvinutou denticí. V oligocénu se však tato skupina rozdělila na skupiny *Mysticeti* (kosticovci) a *Odontoceti* (ozubení), které existují dodnes (Davit-Béal a kol., 2009, Deméré a kol., 2008). Samozřejmě, že oligocénní kosticovci vypadali odlišně než dnešní známé druhy. Byli totiž ozubení. Zástupce nejbazálnějšího kladu je *Janjucetus hunderi*. Jeho lebka i zubní morfologie se značně liší od ostatních kosticovců, a podrobně ji popsal Fitzgerald (2006). Původně se zdálo, že *Janjucetus* sdílí se všemi kosticovci pohyblivou symfýzu spodní čelisti. Nedávno se ale prokázalo, že měl pouze malou symfýzu se zvrásněným povrchem a navíc suturovanou, takže nemohlo docházet k pohybům zvětšujícím objem ústní dutiny při nabírání vody a jejím následném protlačení přes filtr – zde ještě pouze zubní (Obr. 28.). Na druhou stranu u *Janjucetus* dochází k rozšiřování rostra a ztenčování hran maxil (Fitzgerald, 2012). Postupně se tyto lebeční znaky čím dál více přizpůsobovaly nasávání vody s potravou – symfýza začala být pohyblivá, mandibuly se laterálně zploštily a okraje maxil ztenčily. Hlavně však došlo ke zvětšení ústní dutiny (Deméré a kol., 2008).



Obr. 28 – Horní čelist kytovce *Janjucetus hunderi* s heterodontním chrupem. Pilovité výběžky na zubech nejspíše sloužily k zachycení potravy. Převzato z Fitzgerald (2006).

Co však bylo první – zda svazky keratinózních štětín vyrůstající mezi jednotlivými zuby, nebo nedostatek větší potravy a proto potřeba využívat i tu menších rozměrů, se dnes asi nedozvíme. První výskyt těchto štětín, ze kterých vznikly v průběhu času dnešní kostice, lze poměrně dobře odhalit z fosílií. U dnešních kosticových velryb se totiž vyvíjí po stranách horní čelisti série pomocných kanálků, kterými přes kost procházejí cévy a nervy až ke kosticím (Obr. 29. A, B). U pozdně oligocéních, ozubených druhů (*Aetiocetus weltoni*, *Aetiocetus cotylalveus* a *Chonecetus goedertorum*) jsou na lebkách patrné stejné otvůrky (Obr. 29. C). Z toho lze usuzovat, že u těchto druhů nejspíše docházelo k výskytu obou struktur, neboť všichni pozdější zástupci mají v dospělosti již zuby zcela nahrazeny keratinózními kosticemi (Deméré a kol., 2008).



Obr. 29 – Foramina na patře recentní velryby (a, b) a druhu *Aetiocetus weltoni* (c). c – Šipky ukazují foramina, patrné jsou i zuby. Převzato z Deméré a kol. (2008).

8. Závěr

K redukci či ztrátě odolného, kalcifikovaného chrupu, došlo v evoluci obratlovců několikrát nezávisle na sobě (Obr. 1.). Každá skupina živočichů se s ní vypořádala odlišně a já jsem se ve své bakalářské práci zaměřila na ty, kteří k tomuto účelu použili rohovinu. Skupiny s takovými strukturami se dají nalézt ve všech třídách obratlovců. Želvy a ptáci mají čelisti pokryty keratinizovanou ramfotékou, podobně jako některé ryby s rohovinovým povrchem čelistí. Ryby ale mají tuto strukturu pouze jako doplněk jinak funkčních kalcifikovaných zubů v ústní dutině a fáryngu. U ryby z nadřádu *Ostariophysi* dokonce evoluce rohovinového povrchu pokročila až k vývoji jednobuněčných výběžků – tzv. uncul na tomto povrchu. Další skupinou, mající mimo jiné rohovinový povrch čelistí, jsou pulci. Ústní aparát těchto žabích larev je tvořen orálním diskem s řadami jednobuněčných keratinózních zoubků a již výše zmíněného rohovinového povrchu čelistí. Podobnou stavbu orálního aparátu mají i bezčelistnaté mihule. Jejich orální disk je však poset mnohobuněčnými zuby z rohoviny a funkci rohovinového povrchu zastává soustava keratinózních lišt. Mnohobuněčné zuby, i když trochu jiné vnitřní stavby, má i druhá skupina bezčelistnatých obratlovců – sliznatky. Velryby, poslední skupina zmiňována v této práci, není stavbou svých keratinózních kostic podobná žádné výše popsané skupině. Tyto mnohobuněčné kostice by se ale daly s jistým nadhledem přirovnat k jednobuněčným unculům ryb – a to jako aparát sloužící k filtraci potravy z vody či bahna.

Při snaze zjistit, v čem je keratin lepší než kalcifikovaný zub, můžeme vzít v úvahu to, že všechny rohovinové struktury mají neukončený růst, a tudíž i možnost neustálé opravy. Většinou tedy, když mihulím či pulcům keratinózní zub vypadne nebo je poškozen, může být tento okamžitě nahrazen již zralým, náhradním zoubkem. U pravých, kalcifikovaných zubů, které k vytvoření potřebují delší dobu maturace specializovaných, ultratvrdých tkání, může být zásadní nevýhodou právě problém s jejich rychlou obnovou. V životě mihulí i pulců jde prakticky o stejnou věc – co nejdříve pořádně vyrůst a dospět, a snad proto mohou mít keratinózní zuby, nenáročné na udržování a obnovu, evoluční výhodu před trvalým chrupem.

Zdroje

- ALIBARDI, L.(2002):** Immunocytochemical localization of keratins, associated proteins and uptake of histidine in the epidermis of fish and amphibians. *Acta histochemica*, 104(3), 297–310.
- ALIBARDI, L.(2009):** Embryonic keratinization in vertebrates in relation to land colonization. *Acta Zoologica (Stockholm)*, 90, 1–17.
- ALIBARDI, L.(2010):** Cornification of the Beak of *Rana dalmatina* Tadpoles Suggests the Presence of Basic Keratin-Associated Proteins. *Zoological Studies* 49(1), 51-63.
- ALIBARDI, L., SEGALLA, A.(2011):** The Process of Cornification in the Horny Teeth of the Lamprey Involves Proteins in the Keratin Range and Other Keratin-Associated Proteins., *Zoological Studies*, 50(4), 416-425.
- ALTIG, R.(2006):** Discussions of the origin and evolution of the oral apparatus of anuran tadpoles. *Acta Herpetologica*, 1(2), 95-105.
- ALTIG, R.(2007):** A Primer For The Morphology Of Anuran Tadpoles. *Herpetological Conservation and Biology*, 2(1), 71-74.
- ALTIG, R., PACE, W. L.(1974):** Scanning Electron Photomicrographs of Tadpole Labial Teeth. *Journal of Herpetology*, 8(3), 247-251.
- ALTIG, R., MCDIARMID, R. W.(1999):** Tadpoles: the biology of anuran larvae. Chicago: University of Chicago Press, s. 35-48. ISBN 0-226-57763-4.
- BONACCI, A., BRUNELLI, E., SPERONE, E., TRIPEPI, S.(2008):** The oral apparatus of tadpoles of *Rana dalmatina*, *Bombina variegata*, *Bufo bufo*, and *Bufo viridis* (Anura). *Zoologischer Anzeiger*, 247, 47–54.
- BONSER, R. H. C.(1996):** Comparative mechanics of bill, claw and feather keratin in the Common Starling *Sturnus vulgaris*. *Journal of Avian Biology*, 27(2), 175-177.
- BONSER, R. H. C., WITTER, M. S.(1993):** Indentation Hardness of the Bill Keratin of the European Starling. *The Condor*, 95(3), 736-738.
- BRAGULLA, H. H., HOMBERGER, D. G.(2009):** Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*, 214, 516–559.
- CANDIOTI, M. F. V., ALTIG, R.(2010):** A survey of shape variation in keratinized labial teeth of anuran larvae as related to phylogeny and ecology. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 609–625.
- CANDIOTI, M. F. V., BELÉN HAAD, B., BALDO, D., KOLENC, F., BORTEIRO, C., ALTIG, R.(2011):** Different pathways are involved in the early development of the transient oral apparatus in anuran tadpoles (Anura: Leiuperidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 104, 330–345.
- DAVIT-BÉAL, T., CHISAKA, H., DELGADO, S., SIRE, J.-Y.(2007):** Amphibian teeth: current knowledge, unanswered questions, and some directions for future research. *Biological Reviews*, 82, 49–81.
- DAVIT-BÉAL, T., TUCKER, A. S., SIRE, J.-Y.(2009):** Loss of teeth and enamel in tetrapods: fossil record, genetic data and morphological adaptations. *Journal of Anatomy*, 214, 477–501.
- DAWSON, J.(1969):** The Keratinised Teeth of *Mixine glutinosa*. A Histological, Histochemical, Ultrastructural and Experimental Study. *Acta Zoologica*, 50, 35-68.
- DEMÉRÉ, T. A., MCGOWEN, M. R., BERTA, A., GATESY, J.(2008):** Morphological and Molecular Evidence for a Stepwise Evolutionary Transition from Teeth to Baleen in Mysticete Whales. *Systematic Biology*, 57(1), 15-37.
- DONOGHUE, P. C. J., SANSOM, I. J.(2002):** Origin and Early Evolution of Vertebrate Skeletonization. *Microscopy Research and Technique*, 59, 352–372.
- FITZGERALD, E. M. G.(2006):** A bizarre new toothed mysticete (Cetacea) from Australia and the early evolution of baleen whales. *Proceedings of the Royal Society B*, 273, 2955-2963.
- FITZGERALD, E. M. G.(2012):** Archaeocete-like jaws in a baleen whale. *Biology Letters*, 8, 94-96.
- FRASER, G. J., CERNÝ, R., SOUKUP, V., BRONNER-FRASER, M., STREELMAN, J.(2010):** The odontode explosion: The origin of tooth-like structures in vertebrates. *Bioessays*, 32, 808-817.

- GAFFNEY, E. S.(1990):** The comparative osteology of the triassic turtle *Proganochelys*. Bulletin of the American Museum of Natural History, 194.
- GAFFNEY, E. S., J. HUTCHISON, H., JENIUNS, F. A., MEEIER, L. J.(1987):** Modern Turtle Origins: The Oldest Known Cryptodire. Science, New Series, 237(4812), 289-291.
- GAISLER, J., ZIMA, J.(2007):** Zoologie obratlovců. Vyd. 2., preprac. Praha: Academia, 692 s. ISBN 978-802-0014-849.
- GEERINCKX, T., DE POORTER, J., ADRIAENS, D.(2007):** Morphology and Development of Teeth and Epidermal Brushes in Loricariid Catfishes. Journal of morphology, 268, 805–814.
- GENBRUGGE, A. a kolektiv.(2012):** Structural tissue organization in the beak of Java and Darwin's finches. Journal of Anatomy, 221, 383-393.
- GOSNER, K. L.(1959):** Systematic Variations in Tadpole Teeth with Notes on Food. Herpetologica, 15(4), 203-210.
- GROSJEAN, S., VENCES, M., DUBOIS, A.(2004):** Evolutionary significance of oral morphology in the carnivorous tadpoles of tiger frogs, genus *Hoplobatrachus* (Ranidae). Biological Journal of the Linnean Society, 81, 171–181.
- HARRIS, M. P., HASSO, S. M., FERGUSON, M. W. J., FALLON, J. F.(2006):** The Development of Archosaurian First-Generation Teeth in a Chicken Mutant. Current Biology, 16, 371–377.
- HIERONYMUS, T. L, WITMER, L. M.(2010):** Homology and Evolution of Avian Compound Rhamphothecae. The Auk, 127(3), 590–604.
- HILLIARD, R. W., POTTER, I. C., MACEY, D. J.(1985):** The Dentition and Feeding Mechanism in Adults of the Southern Hemisphere Lamprey *Geotria australis* Gray. Acta Zoologica, 66(3), 159-170.
- HIQBIARILANTO, T. R., RANDRIANIAINA, R.-D., GLOS, J., STRAUß, A., VENCES, M.(2010):** Description of ten tadpoles in the genus *Boophis* from Madagascar. Zootaxa, 2694, 1–25.
- HUNT, G. R.(1996):** Manufacture and use of hook-tools by New Caledonian crows. Nature, 379, 249-251.
- HUYSEUNE, A., SIRE, J.-Y.(1998):** Evolution of patterns and processes in teeth and tooth-related tissues in non-mammalian vertebrates. European Journal of Oral Sciences, 106, 437-481.
- HUYSEUNE, A., SIRE, J.-Y., WITTEN, P. E.(2009):** Evolutionary and developmental origins of the vertebrate dentition. Journal of Anatomy, 214, 465–476.
- JOSHI, S. C., BISHT, I., ARGAWAL, S. K.(2012):** Study of the "Unculi" of *Pseudocheneis sulcatus* (McClelland) (Sisoridae) fish of Kumaun Himalaya. Nature and Science, 10(3), 33-38.
- JOYCE, W. G.(2007):** Phylogenetic Relationships of Mesozoic Turtles, Bulletin of the Peabody Museum of Natural History, 48(1), 2-102.
- KHAN, M. S., MUFTI, S. A.(1994):** Oral Disc Morphology of Amphibian Tadpole and Its Functional Correlates. Pakistan Journal of Zoology, 26(1), 25-30.
- LETHBRIDGE, R. C., POTTER, I. C.(1981):** The Development of Teeth and Associated Feeding Structures During the Metamorphosis of the Lamprey, *Geotria australis*. Acta Zoologica, 62(4), 201-214.
- LI, CH. a kolektiv.(2008):** An ancestral turtle from the Late Triassic of southwestern China, Nature, 456 (27), 497-501.
- LOUCHART, A., VIRIOT, L.(2011):** From snout to beak: the loss of teeth in birds. Trends in Ecology and Evolution, 26(12), 663-673.
- MANION, P. J., PIAVIS, G. W.(1977):** Dentition Throughout the Life History of the Landlocked Sea Lamprey, *Petromyzon marinus*. Copeia, 1977(4), 762-766.

- PINKY, MITTAL, S., YASHPAL, M., OJHA, J., MITTAL, A. K.(2004):** Occurrence of keratinization in the structures associated with lips of a hill stream fish *Garra lamta* (Hamilton) (Cyprinidae, Cypriniformes). *Journal of Fish Biology*, 65, 1165–1172.
- ROBERTS, T. R.(1982):** Unculi (Horny Projections Arising from Single Cells), an Adaptive Feature of the Epidermis of Ostariophysan Fishes. *Zoologica Scripta*, 11, 55–76.
- SAWYER, R. H. a kolektiv.(2000):** The Expression of Beta (β) Keratins in the Epidermal Appendages of Reptiles and Birds. *American Zoologist*, 40(4), 530–539.
- SHAW, J. P.(1979):** The time scale of tooth development and replacement in *Xenopus laevis* (Daudin). *Journal of Anatomy*, 129(2), 323–342.
- SIRE, J.-Y., HUYSEUNE, A.(2003):** Formation of dermal skeletal and dental tissues in fish: a comparative and evolutionary approach. *Biological Reviews*, 78, 219–249.
- SLAVKIN, H. C., GRAHAM, E., ZEICHNER-DAVID, M., HILDEMAN, W.(1983):** Enamel-Like Antigens in Hagfish: Possible Evolutionary Significance. *Evolution*, 37(2), 404–412.
- STARRETT, P.(1960):** Descriptions of Tadpoles of Middle American Frogs. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan*, 110.
- STETTENHEIM, P. R.(2000):** The Integumentary Morphology of Modern Birds—An Overview. *American Zoologist*, 40, 461–477.
- STOCK, D. W., JACKMAN, W. R., TRAPANI, J.(2006):** Developmental genetic mechanisms of evolutionary tooth loss in cypriniform fishes. *Development*, 133, 3127–3137.
- SZEWCIW, L. J., DE KERCKHOVE, D. G., GRIMA, G. W., FUDGE, D. S.(2010):** Calcification provides mechanical reinforcement to whale baleen α -keratin. *Proceedings of the Royal Society B*, 277(1694), 2597–2605.
- TRIPATHI, P., MITTAL, A. K.(2010):** Essence of keratin in lips and associated structures of a freshwater fish *Puntius sophore* in relation to its feeding ecology: Histochemistry and scanning electron microscope investigation. *Tissue and Cell*, 42, 223–233.
- TRIPATHI, P., MITTAL, A. K.(2012):** Diversity of Lips and Associated Structures in Fishes by SEM. *Scanning Electron Microscopy, InTech*, ISBN: 978-953-51-0092-8.
- VAN HEMERT, C., HANDEL, C. M., BLAKE, J. E., SWOR, R. M., O´HARA, T. M.(2012):** Microanatomy of Passerine Hard-Cornified Tissues: Beak and Claw Structure of the Black-capped Chickadee (*Poecile atricapillus*). *Journal Of Morphology*, 273, 226–240.
- VENCES, M., PUENTE, M., NIETO, S., VIEITES, D. R.(2002):** Phenotypic plasticity of anuran larvae: environmental variables influence body shape and oral morphology in *Rana temporaria* tadpoles. *Journal of Zoology, London*, 257, 155–162.
- WIENS, J. J.(2011):** Re-evolution of lost mandibular teeth in frogs after more than 200 million years, and re-evaluating Dollo’s law. *Evolution*, 65(5), 1283–1296.
- WYNEKEN, J., (2001):** The Anatomy of Sea Turtles. U.S. Department of Commerce NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470, 1–172.
- YASHPAL, M., KUMARI, U., MITTAL, S., MITTAL, A. K.(2009):** Morphological Specializations of the Buccal Cavity in Relation to the Food and Feeding Habit of a Carp *Cirrhinus mrigala*: A Scanning Electron Microscopic Investigation. *Journal of morphology*, 270, 714–728.
- YOSHIE, S., HONMA, Y.(1979):** Scanning Electron Microscopy of the Buccal Funnel of the Arctic Lamprey, *Lampetra japonica*, during Its Metamorphosis, with Special Reference to Tooth Formation. *Japanese Journal of Ichthyology*, 26(2), 181–191.