

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**  
Katedra parazitologie  
Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



Alžběta Johánková

**Invaze hostitelských buněk mikrosporidiemi, zástupci Cryptomycota a Aphelida**  
**Invasion of host cells by microsporidia, representatives of Cryptomycota and Aphelida**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Doležal, PhD.

Praha, 2021

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Pavla Doležala, PhD. a že jsem uvedla všechnu použitou literaturu. Dále prohlašuji, že tuto práci ani její část jsem nepoužila k získání jiného akademického titulu.

V Praze, 11. 8. 2021

Alžběta Johánková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla srdečně poděkovat svému školiteli, Mgr. Pavlu Doležalovi, PhD. za jeho nenásilné, a přesto precizní vedení. Obrovský a upřímný dík patří mým nejbližším přátelům a mojí úžasné podporující rodině, kteří ve mně věřili a po dobu psaní této práce se mnou měli neuvěřitelnou trpělivost.

## **Abstrakt**

Zástupci skupin Aphelida, Cryptomycota a Microsporidia jsou obligátní intracelulární parazité, kteří napadají širokou škálu hostitelů. Infikují je prostřednictvím unikátního invazního aparátu, ve kterém hraje důležitou roli struktura zvaná penetrační trubice. Za použití této trubice proráží stěnu hostitele a uvnitř hostitelských buněk přechází do rychle se množícího trofického stádia. Penetrační trubici také často využívají při opuštění hostitele. Hlavním cílem této práce je proto detailněji představit způsob invaze a strukturu penetračního aparátu těchto tří skupin organismů s důrazem na jejich vzájemnou příbuznost, ale i jejich odlišné životní strategie. V širším kontextu je studium biologie těchto organismů důležité i z fylogenetického hlediska, neboť jejich evoluční historie by mohla napomoci objasnit vývoj celé říše Fungi. Vědecká komunita doposud věnovala největší pozornost zejména skupině Microsporidia a o zbylých skupinách tak schází podrobnější informace.

**Klíčová slova:** afelidie, Cryptomycota, mikrosporidie, Rozella, penetrační trubice, invaze

## **Abstract**

Aphelida, Cryptomycota and Microsporidia representatives are obligatory intracellular parasites which attack a wide range of hosts. They infect them with a unique invasive apparatus in which so-called penetrating tube structure plays an important role. They pierce the host's wall using this tube and enter rapidly multiplying trophic stage within the host's cell. Often, they also use the penetration tube when leaving the host. Therefore, the main goal of this work is to present the method of invasion and the structure of the penetration apparatus of these three groups of organisms in more details with an emphasis on their mutual relationship but also their different life stages. In a broader context, study of these organisms is also important from a phylogenetic point of view as their revolutionary history could help clarify the whole Fungi kingdom development. Up until now the scientific community has paid the most attention to the Microsporidia group and detailed information about the remaining groups is lacking.

**Key words:** Aphelida, Cryptomycota, Microsporidia, Rozella, penetration tube, invasion

## Obsah

1	Úvod.....	1
2	Aphelida .....	2
2.1	Životní cyklus a invaze.....	2
2.2	Penetrační trubice .....	6
2.3	Zástupci .....	8
2.3.1	Aphelidium.....	9
2.3.2	Amoeboaphelidium .....	9
2.3.3	Pseudaphelidium .....	10
2.3.4	Paraphelidium.....	10
2.4	Aphelida vs Fungi.....	10
2.5	Hospodářský význam .....	11
3	Cryptomycota .....	11
3.1	Životní cyklus a způsob invaze .....	12
3.2	Vývoj rozhraní mezi parazitem a hostitelem.....	16
3.3	Hospodářský význam .....	18
4	Microsporidia .....	18
4.1	Stádia životního cyklu .....	18
4.1.1	Spora.....	19
4.1.2	Meront, sporont a sporoblast.....	21
4.2	Invaze do hostitele .....	22
4.3	Hospodářský význam .....	24
5	Porovnání skupin Aphelida, Cryptomycota a Microsporidia.....	25
6	Závěr.....	28
7	Seznam použité literatury.....	29

# 1 Úvod

Aphelida, Cryptomycota a Microsporidia jsou skupiny jednobuněčných intracelulárních parazitů. Tito parazité sdílejí podobnou evoluční historii a pravděpodobně se jedná o bazální či sesterské skupiny k říši Fungi. Výše zmíněné organismy do hostitele vstupují za použití injekční trubice, což je velmi ojedinělý fenomén a nelze ho pozorovat téměř u žádné jiné skupiny organismů.

Cílem této práce je popsání a porovnání invazního aparátu a způsobu invaze do hostitele u každé výše zmíněné skupiny. Proto je nezbytné se zaměřit na životní cyklus a samotný proces invaze jednotlivých skupin a následné shrnutí případných shodných znaků či naopak rozdílů tohoto procesu. U každé skupiny je také zmíněn její vliv na člověka a hospodářství či její případná ekologická role.

Na rozdíl od názvu práce jsou její úvodní kapitoly věnovány skupině Aphelida, která představuje nejméně odvozenou skupinu a jejíž genom se v mnohém podobá pravým houbám. Následuje kapitola o zástupcích skupiny Cryptomycota, zejména pak o jejím nejznámějším rodu *Rozella*. Tomu je věnována nepoměrně větší pozornost oproti ostatním zástupcům skupiny. Hlavním důvodem je, že způsob invaze rodu *Rozella* je nejlépe objasněn a zároveň lze s jistotou prohlásit, že tento rod do skupiny Cryptomycota vskutku náleží. Fylogenetická pozice ostatních rodů této skupiny tak jednoznačná není a navíc se svým životním cyklem často podobají spíše mikrosporidiím. Kapitola pojednávající o skupině Cryptomycota je tak i pojítkem mezi skupinami Aphelida a Microsporidia. Skupině Microsporidia jsou věnovány závěrečné kapitoly práce, neboť se způsob invaze hostitelských buněk mikrosporidiemi částečně liší od strategie dvou výše zmíněných skupin. Také se pravděpodobně jedná o nejvíce evolučně divergovanou skupinu. I přesto bude stále kladen důraz na společnou evoluční historii těchto skupin a na podtržení výjimečnosti jejich invazního aparátu.

## 2 Aphelida

Aphelida, česky také afelidie, jsou eukaryotičtí obligátní intracelulární parazitoidi vodních řas (Cavalier-Smith, 2013). Rozlišujeme čtyři rody afelidií – *Aphelidium*, *Amoebophilidium*, *Pseudophilidium* a *Paraphelidium*. Jedná se převážně o sladkovodní organismy, avšak rod *Pseudophilidium* nacházíme pouze v mořské vodě (Sergey A. Karpov et al., 2019).

Výzkum afelidií započal na konci 19. století, kdy německý mykolog a botanik Wilhelm Zopf objevil a popsal rod *Aphelidium*. Další rod - *Amoebophilidium* - byl popsán až o 40 let později a v obou případech se vyskytly problémy s taxonomickým zařazením těchto organismů. Kvůli svému životnímu cyklu byly sice považovány za „houbové živočichy“, problematika však byla existence améboidního stádia, které je pro houby atypické (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014). Do dnešní doby je taxonomie afelidií v některých případech nejasná. Hlavním důvodem je absence zevrubných fylogenetických analýz zapříčiněná zejména malým vědeckým zájmem o tuto skupinu organismů, a to navzdory pravděpodobně velmi důležité evoluční pozici afelidií vzhledem k objasnění evoluce hub a houbám podobných organismů (Torruella et al., 2017).

To vše je umocněno jedinečnou biologii afelidií, které jakožto intracelulární parazitoidi vždy způsobují smrt svého hostitele. Tento fakt afelidie odlišuje od příbuzných skupin Cryptomycota i od mikrosporidií, jejichž zástupci se svého hostitele snaží udržet naživu.

### 2.1 Životní cyklus a invaze

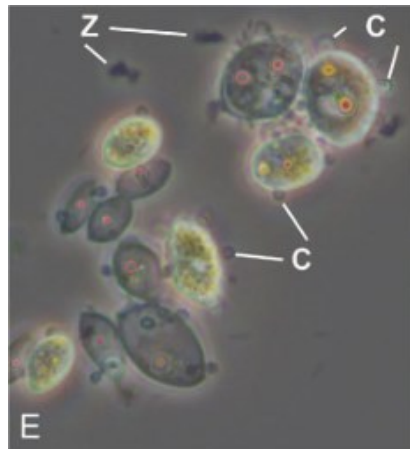
Životní cyklus afelidií je poměrně komplexní (Obr. 4). Z hlediska životních forem se jedná o améboflageláty, tj. organismy, které během svého života střídají stádia améby a bičíkovce (Sergey A. Karpov, Tsvetkova, et al., 2017). Celý životní cyklus parazitoida proběhne za zhruba 3 až 4 dny od počátku infekce (Letcher et al., 2013).

Prvním stádiem životního cyklu je pohyblivá zoospora. Ta po nalezení hostitele začne prudce rotovat, čímž dojde k zanoření bičíku do buňky a afelidie následně encystuje (Obr. 1) (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Benzerara, et al., 2014). Samotné zanoření bičíku probíhá velmi rychle a nezabere více než 4 minuty (S.A. Karpov et al., 2016).

Vzniklá cysta je pokrytá tenkou polysacharidovou stěnou a představuje klíčové stádium pro invazi parazitoida do hostitele. Cysta kopíruje pseudopodiemi povrch hostitelské buňky a hledá místo, kterým lze do buňky vstoupit, například prasklinu v buněčné stěně (dále BS) či překryv křemičitých plátů u rozsivek (Schweikert & Schnepf, 1997). Pokud otvor v BS není nalezen, k infekci nedochází. Pakliže je ale poškození stěny úspěšně nalezeno, cysta pomocí



apresoria pevněji přilne k BS hostitele a proráží jeho BS pomocí penetrační trubice (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014).



**Obr. 1** – Ukázka zoospor (Z) a následně encystovaných parazitoidů (C) (Letcher et al., 2015)

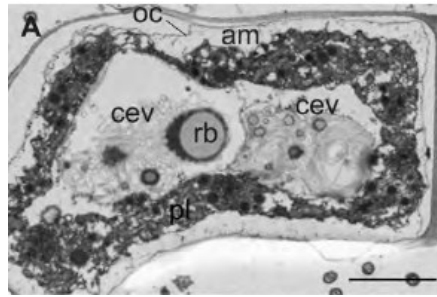
Zásadní vliv na vystřelení penetrační trubice a následnou invazi cysty do hostitelské buňky má posteriorní vakuola (Obr. 2). Je odvozena od Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula a může zabírat až polovinu obsahu buňky (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Benzerara, et al., 2014). Po přilnutí cysty k BS hostitele začne posteriorní vakuola bobtnat, což vede k postupnému vytlačení obsahu cysty do hostitelské buňky skrz penetrační trubicí (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014). Jako první trubicí vždy prochází cytoplazma, pak následuje mitochondrie a ostatní organely (např. lipidová tělíska) a jako poslední je penetrační trubicí protlačeno buněčné jádro (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Benzerara, et al., 2014). Během pronikání obsahu cysty do hostitelské buňky také dochází k postupnému odrolování infekční trubice podobně, jako se rolují prsty rukavic (Schweikert & Schnepf, 1997). Cysta, která může obsahovat zbytky cytoplazmy a membrán parazitoida může nějakou dobu setrvávat na povrchu hostitele přichycena za penetrační trubicí i poté, co parazitoid tuto cystu opustil (Sergey A. Karpov et al., 2013). Při napadení mnohobuněčného hostitele nemusí cysty invadovat do všech hostitelských buněk a některé buňky tak zůstávají zachované (Tcvetkova et al., 2019).



**Obr. 2** – Bobtnající posteriorní vakuola (označena šipkou) zaručující úspěšnou invazi parazitoidea (cy) (Sergey A. Karpov et al., 2013)

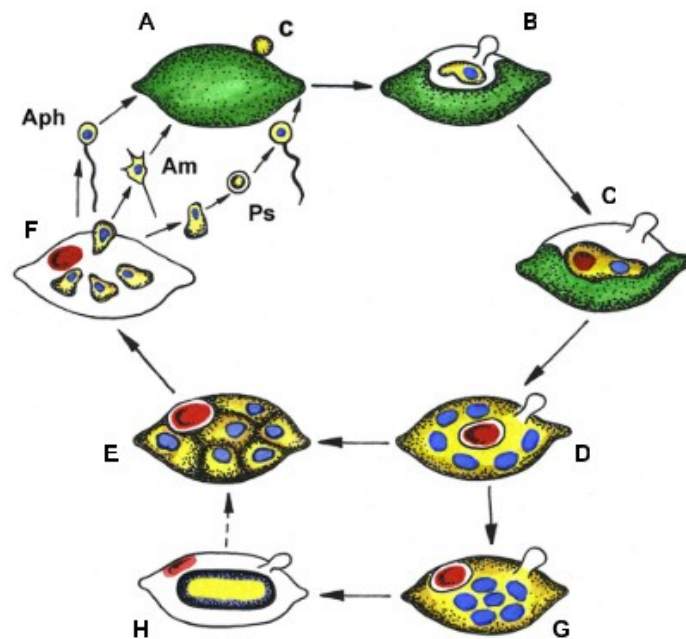
Po vniknutí celého obsahu spory do hostitele buňky přechází parazitoid do stádia intracelulární fagotrofující améby (trofonta), která fagocytózou pohlcuje obsah hostitele a transportuje ho do své trávicí vakuoly (S.A. Karpov et al., 2016). V pozdější fázi tohoto stádia může mít améba větší množství potravních vakuol, avšak trávicí vakuolu lze pozorovat vždy jen jednu. Potravní vakuoly mají nejspíše funkci pouze transportní, protože pozřený obsah v nich zůstává nedotčený (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Benzerara, et al., 2014). Trofont nejdříve pohlcuje střed hostitelské buňky, pak periferní chloroplasty a nakonec pozře hostitelské mitochondrie (Sergey A. Karpov, Tsvetkova, et al., 2017). V tomto stádiu lze pozorovat extrémní proliferační aktivitu parazitoidea a trofont následně prochází dalšími stádii – roste a proměňuje se v mnohojaderné endobiotické plasmodium (Letcher & Powell, 2019).

Plasmodium je nejdelší stadium celého životního cyklu. Obsah hostitelské buňky ukládá do potravních vakuol, ze kterých je poté potrava transportována do hlavní trávicí vakuoly, kde dojde k jejímu zpracování. V této aktivitě pokračuje plasmodium do té doby, než v hostitelské buňce nezbyvá nic jiného než pro afelidie nestravitelná hmota. Tato hmota je pak v plasmodiu uložena ve formě jednoho či dvou zbytkových tělísek uložených kolem centrální trávicí vakuoly a plasmodium se ocitne v amorfní matrix hostitelské buňky (Obr. 3) (Sergey A. Karpov et al., 2013). Zralé plasmodium se následně rozpadne na množství jednojaderných, jednobičíkatých zoospor, které opouštějí hostitelskou buňku. Vytvořený posteriorní bičík je určujícím znakem zralých zoospor. Při jejich tvorbě afelidie netvoří vlastní stěnu sporangia, ale přejímají stěnu hostitele (Sergey A. Karpov, Tsvetkova, et al., 2017; Sergey A. Karpov et al., 2020).



**Obr. 3** – Stadium plasmodia (**pl**) s velkou centrální vakuolou (**cev**) a zbytkovým tělískem (**rb**); plasmodium se nachází v amorfní matrix hostitele (**am**) (Sergey A. Karpov et al., 2020)

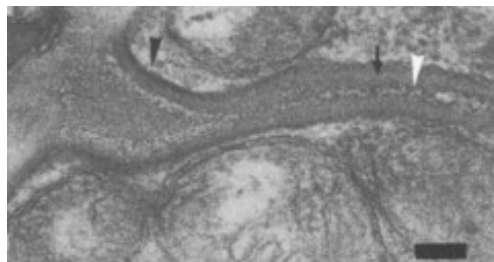
Zoospory opouštějí hostitelskou buňku místem, kterým procházela infekční trubice. Výjimečně se stává, že ze sporangia vycházejí mnohojaderné buňky parazitoida, které však nevedou k dalšímu vývoji a záhy hynou (Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014, Letcher & Powell, 2019).



**Obr. 4** – Schéma životního cyklu afelidií (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014); **Aph** – Aplanetidum, **Am** – Amoeboaphelidium, **Ps** – Pseudaphelidium, **c** – cysta, **A** – přichycení a encystace zoospory na povrchu hostitelské buňky, **B** – průnik do hostitele, **C** – pohlcování obsahu buňky fagotrofní amébou, **D** – vznik mnohojaderného plasmodia a jeho úplné vyplnění hostitelské buňky, **E** – dělení plasmodia na jednojaderné buňky, **F** – zoospory opouštějící hostitelskou buňku, **G** – příprava na tvorbu dormantní spory, **H** – vznik dormantní spory; modrá barva – jádro, červená barva – zbytkové tělísko

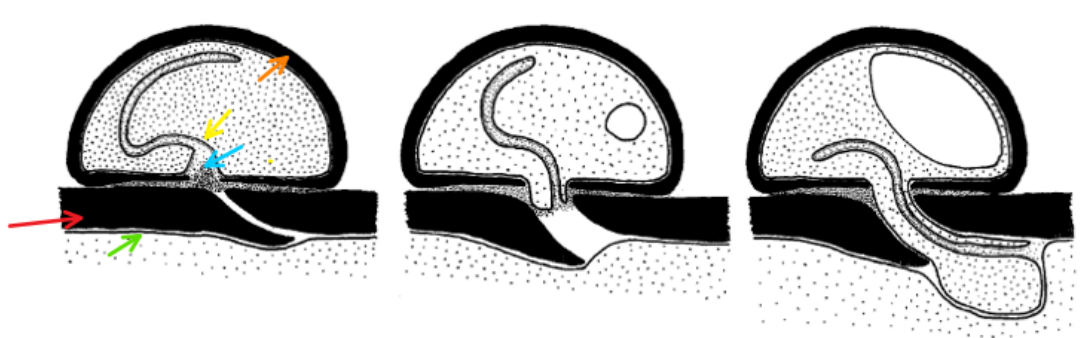
## 2.2 Penetrační trubice

Penetrační trubice je specifickou strukturou cysty afelidií a může dosahovat až pětinasobku její délky (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Benzerara, et al., 2014). Jedná se o plochou a nepravidelně zkroucenou strukturu vychlípenou dovnitř cytoplazmy, která je pravděpodobně přímo odvozena od cystové stěny. Stěna penetrační trubice je tvořena dvěma vrstvami – vnitřní polysacharidovou vrstvou, která je obklopena druhou - tenkou vrstvou z elektrondenzního materiálu. Na straně přisedlé k hostitelské buňce je polysacharidová stěna cysty nahrazena tzv. adhezním diskem, který obsahuje zátku vyplňující ústí penetrační trubice tak, aby nedošlo k jejímu předčasnému vystřelení (Obr. 5).



**Obr. 5** – Ukázka vznikající penetrační trubice (černá šipka) a vznikající zátky (Schweikert & Schnepf, 1997)

V momentě, kdy začne posteriorní vakuola cysty bobtnat, penetrační trubice cysty se začne odrolovávat jako prst u rukavice – trubice se postupně vychlípje proti zátce adhezního disku a je protlačena skrz centrální pór adhezního disku (Obr. 6). Vysouvající se trubice tvoří kanál, kterým prochází obsah parazitoida, dokud v cystě nezůstane nic než pozůstatky membrán, cytoplazmy a posteriorní vakuola (Schweikert & Schnepf, 1997). Po proražení BS dochází k částečné degradaci penetrační trubice, což usnadňuje vlastní průnik do hostitelské buňky (Letcher, Powell, et al., 2017).

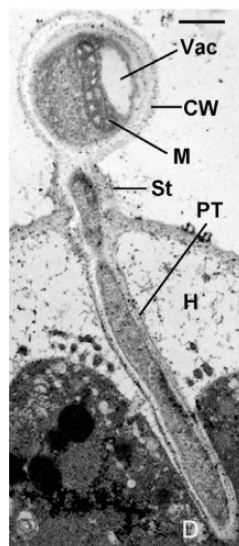


**Obr. 6** – Schéma procesu infekce druhu *Pseudaphelidium drebesi* (Schweikert & Schnepf, 1997) ; **zelená šipka** – plazmatická membrána hostitelské buňky, **červená šipka** – BS hostitelské buňky, **modrá šipka** – zátka v póru adhezního disku, **žlutá šipka** – tenká vrstva BS cysty, propojená s plazmatickou

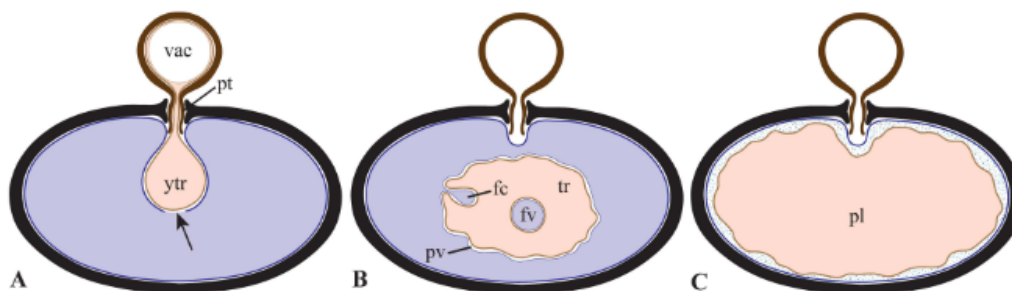
membránou a penetrační trubice od této struktury odvozená, **oranžová šipka** – BS cysty; lze také dobře pozorovat bobtnání posteriorní vakuoly

Odrolování penetrační trubice a následný průnik obsahu parazitoida do buňky hostitele však nejsou způsobeny pouze aktivitou posteriorní vakuoly. Ukazuje se, že vnitrobuněčnému transportu obsahu cysty do hostitele napomáhají mikrotubuly obsažené v samotné penetrační trubici (Sergey A. Karpov, Tsvetkova, et al., 2017).

Důležité je zdůraznit, že penetrační trubice afelidií proráží pouze buněčnou stěnu hostitele, a nikoliv jeho plazmatickou membránu (Obr. 7). I proto se původně uvažovalo o možnosti, že afelidie požírají své hostitele „zvenku“. V tom by také tkvěl rozdíl ve způsobu invaze využívaný afelidiami oproti zástupcům skupiny Cryptomycota. O těch se již dříve vědělo, že obsah cysty se do cytoplazmy hostitele dostává přímo (Schweikert & Schnepf, 1997). Je tomu ale pravděpodobně jinak. Nedávná studie ukázala, že obdobný způsob invaze je nejspíše využíván i afelidiami (Obr. 8). Průchod obsahu cysty penetrační trubicí je zřejmě tak rychlý, že vytvoří tlak dostatečný k lokálnímu proražení hostitelské plazmatické membrány. Tímto omezeným poškozením membrány je injikován téměř celý obsah cysty a hostitelská plazmatická membrána je pak opět zacelena. Dalším důkazem průniku afelidií až do hostitelovy cytoplazmy je uspořádání rozhraní mezi hostitelem a parazitoidem. Cytoplasma afelidií a hostitele je vždy oddělena dvěma membránami a všechna vývojová stádia afelidií jsou následně ohraničena hostitelskou membránou, která se rozpadá až v okamžiku vzniku a nadměrnému pohybu zoospor (Sergey A. Karpov & Paskerova, 2020).



**Obr. 7** – Schéma znázorňující průnik penetrační trubice pouze buněčnou stěnou, a nikoliv plazmatickou membránou hostitelské buňky (Letcher, Powell, et al., 2017)



**Obr. 8** – Důkaz parazitace afelidií na hostiteli „zevnitř“ (Sergey A. Karpov & Paskerova, 2020); **vac** – posteriorní vakuola parasitoida, **pt** – penetrační trubice, **ytr** – afelidie ve stadiu trofonta, **fc** – potravní vakuola, **pv** – parazitatorfnní vakuola, **fv** – trávicí vakuola, **tr** – trofont, **pl** – plasmodium; barvy: **hnědá** – stěna cysty, **černá** – buněčná stěna hostitele, **modrá** – plazmatická membrána hostitele, **růžová** – trofont, případně plasmodium

I přes tento propracovaný systém, kterým afelidní invaze je, není 100% zajištěno, že penetrace BS hostitele proběhne úspěšně. Řasa *Scenedesmus dimorphus*, hostitel rodu *Amoebaphelidium*, je schopna rozeznat přítomnost parasitoida na svém povrchu a reaguje na ni syntézou zátky, která brání průniku penetrační trubice BS (Letcher et al., 2013). Případně dojde k nepřesnému umístění adhezního disku na BS hostitele – penetrační trubice pak „sklouzne“ po BS a putuje pouze po jejím povrchu, aniž by došlo k invazi do hostitele (Schweikert & Schnepf, 1997).

### 2.3 Zástupci

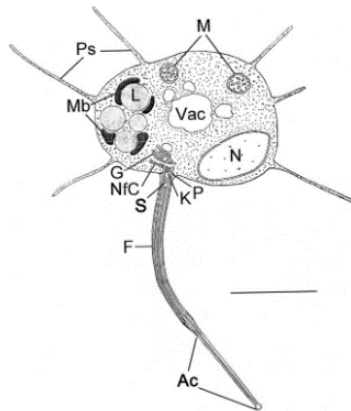
V současné době jsou známy a popsány čtyři rody afelidií, které jsou od sebe poměrně geneticky vzdálené. Nejvíce druhů, osm, bylo prozatím objeveno u rodu *Aphelidium*. Pět druhů je zastoupen rod *Amoebaphelidium*, rod *Paraphelidium* je zastoupen dvěma druhy a od rodu *Pseudaphelidium* je známý pouze jediný druh (Sergey A. Karpov et al., 2020; Sergey A. Karpov, Torruella, et al., 2017; Letcher & Powell, 2019; Tcvetkova et al., 2019).

Důležitým znakem pro taxonomii afelidií jsou zoospory, díky nimž lze od sebe jednotlivé rody odlišit. Základním znakem všech zoospor je přítomnost posteriorního bičíku, typického pro organismy celé nadřazené skupiny Obazoa (Sergey A. Karpov et al., 2013). Pro všechny rody je také charakteristická změna pohybu zoospory při přibližování se k hostiteli. Aktivní plavání ve vodě se mění na améboidní pohyb využívající panožky, který je obzvláště zřejmý při překonávání překážek před hostitelskou buňkou (Sergey A. Karpov, Tcvetkova, et al., 2017). Rozdíly v morfologii jednotlivých rodů jsou dány velikostí a tvarem jejich hostitelů, neboť hostitelská specifita afelidií je velmi široká. Velikost zoospor všech rodů se však

pohybuje v rámci jednotek mikrometrů (S.A. Karpov et al., 2016). Kromě morfologie zoospor mohou jako rozlišovací struktury figurovat ještě dormantní spory či jejich případná absence. Rozhodujícím faktorem pro rozlišení jednotlivých rodů je sekvence 18S rDNA (Letcher & Powell, 2019).

### 2.3.1 *Aphelidium*

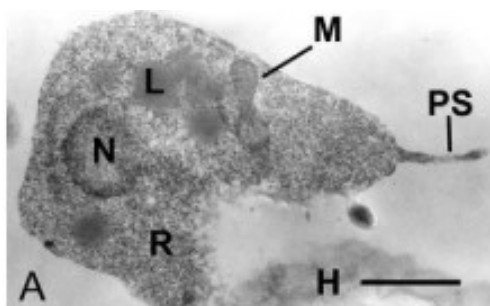
Rod *Aphelidium* je typickým zástupcem afelidií. Tvoří bičíkaté zoospory s bičíkem umístěným na posteriorní straně buňky (Obr. 9). Ve stádiu améby u něj lze pozorovat tvorbu vláknitých pseudopodií – filopodií - ve všech směrech (Seto et al., 2020). Častými hostiteli tohoto rodu jsou řasy ze třídy *Chlorophyceae* (např. *Desmodesmus* či *Chlorococcus*), *Charophyceae* (např. *Coleochaete*) a *Xantophyceae* (např. *Tribonema* či *Botrydiopsis*) (Letcher & Powell, 2019).



**Obr. 9** – Ukázka zoosporu rodu *Aphelidium*; lze pozorovat dobře vyvinutý posteriorní bičík (Letcher, Powell, et al., 2017); **Ac** – akronema, **F** – bičík, **G** – Golgiho aparát, **K** – kinetosom, **L** – lipidové tělísko, **M** – mitochondrie, **Mb** – mikrotělísko, **N** – jádro, **NfC** – centriola nepřipojená na bičík, **P** – opora bičíku, **Ps** – pseudopodie, **S** – spirála, **Vac** - vakuola

### 2.3.2 *Amoeboaphelidium*

Druhým nejpočetněji zastoupeným rodem je rod *Amoeboaphelidium*, který se od rodu *Aphelidium* odlišuje výraznou redukcí posteriorního bičíku, který je zachován buď ve formě imobilního pseudocilia, anebo chybí úplně (Obr. 10). Logicky tím *Amoeboaphelidium* ztrácí schopnost aktivního plavání a lze u něj pozorovat pouze tvorbu četných pseudopodií, zejména filopodií. Typickým hostitelem tohoto rodu jsou řasy třídy *Chlorophyceae* (zejména rody *Scenedesmus*, *Kirchneriella* a *Ankistrodesmus*) (Sergey A. Karpov, Torruella, et al., 2017; Letcher et al., 2013).



**Obr. 10** – Ukázka zoospory rodu *Amoebophilidium* (Letcher et al., 2015); **H** – hostitel, **L** – lipidové tělísko, **M** – mitochondrie, **N** – jádro, **PS** – panožka, **R** - ribozomy

### 2.3.3 *Pseudaphelidium*

Tento mořský rod afelidií je zastoupen pouze jedním druhem, *Pseudaphelidium drebesii* (Schweikert & Schnepf, 1997). Má jediného hostitele, a to řasu *Thalassiosira punctigera* ze třídy *Bacillariophyceae*. Právě rod *Pseudaphelidium* se nejvíce morfologicky odlišuje od ostatních tří rodů. Jeho zoospory jsou sice bičíkaté, ale spíše améboidního tvaru a způsob jejich vzniku je poměrně neobvyklý. Zatímco zoospory ostatních rodů vznikají zaškrcením plasmodia a při jejich dozrání se u nich vyvine posteriorní bičík, plasmodium tohoto rodu se rozdělí na jednoduché buňky, které opustí hostitelskou buňku, ihned encystují a až z těchto cyst jsou produkovány bičíkaté zoospory (Sergey A. Karpov, Torruella, et al., 2017; Letcher et al., 2015).

### 2.3.4 *Paraphelidium*

Rod *Paraphelidium* sdílí podobné morfologické znaky s rodem *Aphelidium* a liší se jen v několika málo odlišnostech. Oproti výše zmíněnému rodu lze u rodu *Paraphelidium* pozorovat kratší bičík a protáhlejší, centrálně lokalizované jádro (Sergey A. Karpov et al., 2019). Tento rod parazituje hlavně na řase *Tribonema* ze třídy *Xantophyceae* (Letcher & Powell, 2019). Postavení rodu *Paraphelidium* ve fylogenetickém stromu je však komplikované. Současné studie zabývající se transkriptomem tohoto rodu totiž poukazují na fakt, že *Paraphelidium* je spíše linií sesterská k houbám, a skupina *Aphelida* by tak byla skupinou polyfyletickou (Torruella et al., 2018).

## 2.4 *Aphelida* vs Fungi

Poznatky o fylogenezi rodu *Paraphelidium* vedou k zamyšlení nad vztahem mezi afelidiemi a říší Fungi. Podle jedné z teorií došlo ke vzniku hub z afelidního organismu, který ztratil schopnost fagotrofie a postupně přešel na osmotrofický způsob příjmu potravy, který je právě pro houby charakteristický (Torruella et al., 2015). Afelidie mají také metabolismus podobný zástupcům říše Fungi (Torruella et al., 2018).



Dalším znakem, který poukazuje na příbuznost s říší Fungi je použití apresoria při přilnutí parazitoida k hostiteli. Apresorium je infekční struktura charakteristická pro parazitické houby, která napomáhá těsnému „přitisknutí se“ parazita ke svému hostiteli (Letcher & Powell, 2019; Ryder & Talbot, 2015). Také invaze penetrační trubicí je podobná invazi hyfami, kterou lze pozorovat u některých hub (Schweikert & Schnepf, 1997). V penetrační trubici rodu *Paraphelidium* byl dokonce nalezen homolog chitinázy třídy V, která je pro houby důležitým enzymem (Torruella et al., 2018).

## 2.5 Hospodářský význam

Pro člověka představují afelidie velké riziko ekonomických ztrát zejména při pěstování rostlinných zdrojů pro produkci biopaliv. Aby mohla biopaliva vyrobená z řas konkurovat palivům z nerostných surovin, musí mít zdroj této biomasy vysokou proliferační rychlost (Greenwell et al., 2010). Jednou z hlavních řas využívaných při tvorbě biopaliv je řasa *Scenedesmus dimorphus*, která je však hlavním hostitelem rodu *Amoebophilidium*. Infekce řasových kolonií ve venkovních nádržích je často fatální pro celou populaci kvůli poměrně krátkému životnímu cyklu afelidií (Letcher et al., 2015).

## 3 Cryptomycota

Pod označením Cryptomycota se skrývá skupina organismů, která skutečně dostává svému názvu. I přesto, že tato skupina byla objevena již v druhé polovině 19. století (Letcher & Powell, 2018), její pozice na fylogenetickém stromu se několikrát změnila a do dnešního dne si odborníci nejsou zcela jisti, kam ji přesně zařadit (Gleason et al., 2012). O tom svědčí i řada různých názvů, jako např. Rozellida (Lara et al., 2010) či Rozellomycota (Corsaro et al., 2014), kterými byla tato skupina také nazývána. Původně byl do této skupiny zahrnutý pouze rod *Rozella*, díky analýze 18S rDNA byli však nalezeni další zástupci, a to rody *Paramicrosporidium*, *Mitosporidium* a *Nucleophaga* (Blackwell et al., 2019; Corsaro et al., 2016; Quandt et al., 2017; Timofeev et al., 2020). Zařazení posledně zmíněného organismu nebylo dosud dostatečně podloženo. Životní cyklus výše zmíněných rodů je však velmi podobný životnímu cyklu a způsobu invaze skupiny Microsporidia a na fylogenetickém stromu tak možná tvoří přechodový článek právě mezi skupinami Cryptomycota a Microsporidia (Bass et al., 2018). Proto se tato práce bude zabývat zejména způsobem invaze rodu *Rozella*.

Zástupci rodu *Rozella* jsou eukaryotické, jednobuněčné, endobiotické a biotrofní organismy, které parazitují na houbách ze skupin Chytridiomycota a Blastocladiomycota, a také na stramenopilech ze skupiny Oomycota. Mezi hostitele patří také jediný rostlinný zástupce, a to řasa *Coleochaete* ze třídy *Charophyceae* (Letcher, Longcore, et al., 2017; Powell

et al., 2017). Jednotlivé druhy rodu *Rozella* lze najít ve sladké i slané vodě, sedimentech i v půdě (Jones et al., 2011). Některé druhy rodu *Rozella* by se daly označit za hyperparazity, neboť mezi jejich hostitele patří často parazité jiných organismů (Gleason et al., 2014).

### 3.1 Životní cyklus a způsob invaze

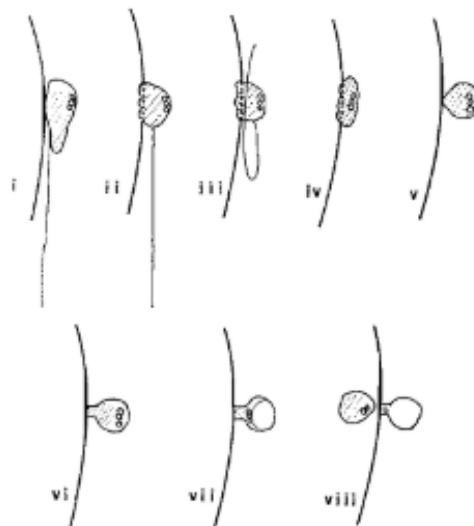
Životní cyklus rodu *Rozella* není příliš komplikovaný. Stejně jako zástupci skupiny Aphelida se živí fagocyticky (Cavalier-Smith, 2013), avšak v porovnání s afelidiemi lze u životního cyklu tohoto rodu nalézt méně životních forem, například zde nelze pozorovat žádné stádium améby (Obr. 11) (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014). Životní cyklus skupiny Cryptomycota obsahuje pouze asexuálně se množící stádia, neboť sexuální rozmnožování u této skupiny zatím nebylo pozorováno (Quandt et al., 2017; Stajich et al., 2009). Doba proběhnutí celého životního cyklu se pohybuje kolem pěti dní (Powell & Letcher, 2019).

Prvním stádiem životního cyklu je pohyblivá zoospora. Na míru úspěšnosti invaze zoospory mají vliv dva faktory zprostředkované hostitelem. Prvním z nich je metabolit neznámého složení vylučovaný hostitelem, který funguje jako atraktant pro zoosporu k místu výskytu hostitelských hyf. Tento chemotaktický pohyb zoospor má dvě fáze. Během první fáze dochází k zaznamenání atraktantu a následné topochemotaxi – pohybu ve směru zvýšené koncentrace tohoto atraktantu. Následuje fáze setrvání v místě vysoké koncentrace atraktantu a snaha adherovat na povrch hostitelské hyfy. Pro úspěšnou adhezi k povrchu hostitele je důležité vlastní složení hostitelské BS, které tak představuje druhý faktor nezbytný pro úspěšnou invazi (Held, 1974).

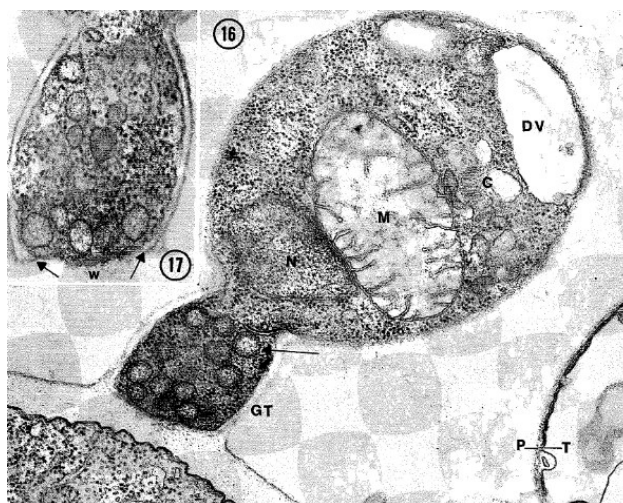
Při kontaktu s hostitelskou BS dojde k zakulacení původně protáhlých zoospor a pohyblivá, bičíkatá zoospora vstupuje do stádia nepohyblivé cysty. Tomuto stádiu předchází překotná retrakce bičíku, která je dokončena zhruba pět minut po dosednutí na BS hostitele (Held, 1973). Následně dochází k omezení adherované plochy na pouhý „disk“ – jedná se o místo, kde došlo k zanoření axonemy. Plazmatická membrána parazita je pak v přímém kontaktu s BS hostitele. V místě kontaktu parazita s hostitelem lze u hostitelské buňky pozorovat vznik tzv. lomasomů. Lomasom vzniká vychlíním plazmatické membrány hostitelské buňky směrem do její cytoplazmy (Moore & McAlear, 1961). Aktivitou multivezikulárních tělísek parazita poté dochází k syntéze BS. BS parazita postrádá chitin, který je tak přítomen pouze u dormantních spor (Held, 1981; Lazarus & James, 2015). Cysta v tento okamžik začne produkovat apresorium, které napomáhá pevnému přichycení parazita k povrchu hostitele (Held, 1973; Powell & Letcher, 2019).

Následuje stádium pevnostěnné spory, které je velmi dynamické, neboť během zhruba tří hodin dochází k četným přestavbám organel uvnitř buňky parazita a na povrchu hostitelské buňky (Powell & Letcher, 2019). Z apresoria se vytváří penetrační trubice, která má nejdříve kolíkovitý tvar (Corsaro et al., 2016). Stěna cysty kolem penetrační trubice vytváří rukávovitou strukturu, která končí v místě dotyku trubice s povrchem BS hostitele (Obr. 12). Penetrační trubice se postupně prodlužuje a za podpory bobtnající distální vakuoly proráží BS hostitelské hyfy. Zvýšeným turgorem uvnitř trubice dochází k odstranění „zátky“ na špičce trubice a posléze dochází k injekci protoplastu parazita do hostitelské hyfy. Reakce hostitele spočívá ve snaze obalit a kompartmentalizovat protoplast parazita svou plazmatickou membránou, čímž ale naopak usnadňuje transport protoplastu do cytoplazmy (Held, 1973; Powell & Letcher, 2019).

Na úspěšnosti penetrace se podílí více faktorů. Ve většině případů je neúspěšná penetrace způsobena nedostatečným vývojem posteriorní vakuoly. K proražení hostitelské BS také dochází jen na hyfách, u kterých nebyla zaznamenána předchozí infekce. V případě předchozího styku s parazitem už totiž není možný vznik vychlípenin BS hostitele. Pro snazší penetraci BS využívá parazit váčků s degradačními enzymy, které jsou uloženy ve špičce penetrační trubice. Tyto enzymy naleptají BS, čímž se usnadní její penetrace (Held, 1972).



**Obr. 11** – Schematické znázornění stádií vedoucích k invazi do hostitele (Held, 1973); **i** - adheze parazita na povrch BS hostitele, **ii** – zakulacení zoospory, **iii** – retrakce bičíku, **iv** – vznik cysty, **v** – změna velikosti adherovaného povrchu na pouhý disk, **vi** – vytvoření apresoria, ze kterého vychází penetrační trubice, **vii** – bobtnání distální vakuoly, **viii** – injekce protoplastu parazita do hyfy hostitele



**Obr. 12** – Snímek znázorňující klíčící cystu i s apresoriem a vznikající penetrační trubicí (Held, 1973); snímek vlevo nahoře poukazuje na stěnu pokrývající penetrační trubicí, která končí v místě styku penetrační trubice s hostitelskou BS; **GT**- penetrační trubice, **N** – jádro, **M** – mitochondrie, **DV** – distální vakuola

Po injekci protoplastu do hostitelské hyfy dochází k rychlému dělení jader a parazit tak přechází do trofického stádia sporangiálního plazmodia. Toto trofické stádium opět postrádá chitinózní BS. Absence BS v trofické fázi je však nejspíše odvozenou adaptací, neboť v genomu rodu *Rozella* byly nalezeny homology chitin syntáz, které jsou typické pro zástupce říše *Fungi* (Berbee et al., 2017; James & Berbee, 2012; Torruella et al., 2015). Sporangální plasmodium, či také zoosporangium, tak využívá BS hostitelské buňky podobně jako afelidie (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014).

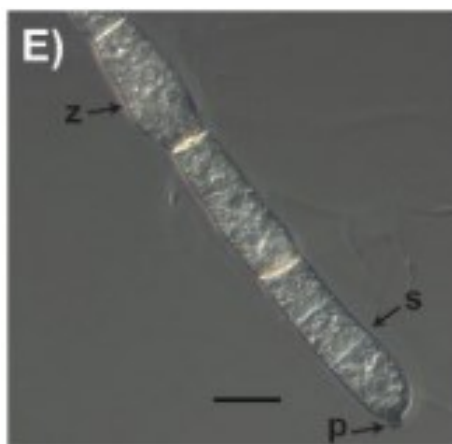
Během zoosporangiální fáze dochází k tvorbě panožek, které napomáhají fagocytóze hostitelského obsahu (Letcher & Powell, 2018). Splýváním jednotlivých fagocytických váčků pak vzniká centrální vakuola, ve které je ukládán nestavitelný materiál (Powell, 1984).

Zoosporangium vzniká vždy jaderným dělením jedné zoospory a podle množství vytvořených zoosporangií uvnitř hostitele můžeme zástupce rodu *Rozella* rozdělit do dvou skupin (Held, 1980). Početnější skupinu tvoří tzv. monosporangiální druhy. U těchto druhů mnohojaderné plasmodium vytváří jedno solitérní zoosporangium na apikálním konci hyfy a zároveň s tvorbou zoosporangia dochází k indukci hypertrofie hostitelské hyfy (Obr. 13) (Gleason et al., 2012; Held, 1981). Zoosporangium často přejímá tvar hypertrofovaného hostitelského sporangia. Mezi druhy tvořící pouze monosporangiální útvary patří například *R. multimorpha*, *R. rhizoclosmatii*, *R. coleochaete* či *R. blastocladiae* (Letcher & Powell, 2018).



**Obr. 13** – Ukázka hypertrofované hyfy se solitérním sporangiem u druhu *R. multimorpha* (Letcher et al., 2018); **sp** – sporangium, **hh** – hostitelská hyfa

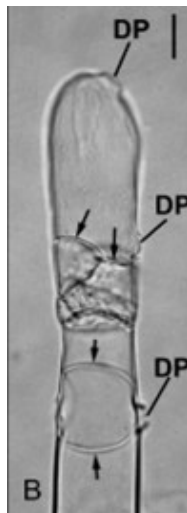
Druhou skupinu představují tzv. polysporangiátní druhy. Tyto druhy indukují u svého hostitele produkci sept, čímž se hyfa hostitele rozdělí na jednotlivé kompartmenty. Dochází tak ke tvorbě navzájem propojených shluků zoosporangií a tento jev není následován hypertrofií hostitelské tkáně (Obr. 14). Hostitelské kompartmenty slouží jako prostor pro vývoj sporangiálních plasmodií či ke vzniku dormantní spory v případě nepříznivých podmínek (Powell et al., 2017; Powell & Letcher, 2019). Na to, jestli se v kompartmentech vyvinou zoosporangia či dormantní spory s ornamentovanou chitinózní BS má vliv také stáří jednotlivých hyf. Při infekci mladých hyf je větší pravděpodobnost vzniku zoosporangií (Held, 1980). Polysporangiátní druhy jsou spíš vzácností, nejznámějším zástupcem je *R. allomycis*. Ke zbylým polysporangiátním druhům pak náleží *R. parva* a *R. septigena* (Letcher & Powell, 2018).



**Obr. 14** – Ukázka četných zoosporangií druhu *R. allomycis*, navzájem oddělených septy (James & Berbee, 2012); **z** – zoosporangium, **s** – septum, **p** – papila

Ve stádiu zoosporangia lze pozorovat zajímavou změnu v metabolismu parazita. Zatímco zoospory mají plně funkční mitochondrii, ve stádiu zoosporangia dochází k degradaci mitochondriálních krist a redukci metabolismu, a to tak, že u všech zástupců rodu *Rozella* nebyl nalezen komplex I důležitý pro průběh oxidativní fosforylace. Zisk ATP je tedy zaručen přenosem z hostitelské mitochondrie přes ADP/ATP přenašeče. To je také důvodem transportu hostitelských mitochondrií k povrchu zoosporangia parazita. U nově vzniklých zoospor jsou však mitochondrie opět plně funkční (Powell et al., 2017; Timofeev et al., 2020).

Po zhruba čtyřech dnech zoosporangium pohltí veškerý obsah hostitelského kompartmentu a následně se rozdělí na několik zoospor. Tyto zoospory již obsahují bičík a ještě ve zoosporangiu se začnou intenzivně a vířivě pohybovat (Powell et al., 2017). Přítomnost motilních zoospor funguje pro hostitele jako signál pro vytvoření „vypouštěcí či únikové struktury“. Touto strukturou se myslí jedna či více papil vznikajících na povrchu BS hostitele (Obr. 15) (Sparrow, 1938). V některých případech se pod papilou zformuje ještě trubicovitá struktura, která pravděpodobně přispívá k efektivnějšímu uvolnění zoospor (Barr & Bandoni, 1979). Zoospory nakonec explozivně unikají z hostitelské buňky, čemuž zřejmě napomáhá zvýšený turgor v zoosporangiu způsobený rychlým pohybem zoospor (Powell et al., 2017). Zoospory opouštějící sporangium jsou jedním z mála okamžiků, který je pod mikroskopem dobře pozorovatelný. Po papile pak na povrchu BS hostitele zůstávají ploché póry (Gleason et al., 2012; Held, 1981).



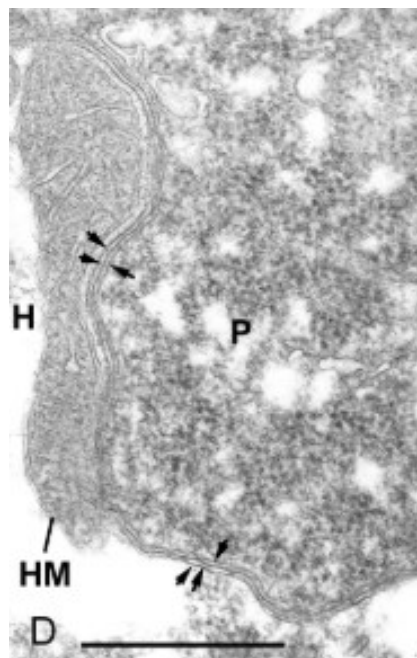
**Obr. 15** – Ukázka „únikových papil“ určených k vypuštění zoospor (Powell et al., 2017); **DP** – „úniková/vypouštěcí papila“, šipky poukazují na septa oddělující jednotlivá zoosporangia

### 3.2 Vývoj rozhraní mezi parazitem a hostitelem

Způsob, jakým se protoplast ocitá v hostitelské cytoplazmě lze odvodit díky pozorování rozhraní mezi parazitem a hostitelem. Injikovaný protoplast způsobí invaginaci hostitelské

plazmatické membrány, což vede ke vzniku dvoumembranového rozhraní, skládajícího se z plazmatické membrány hostitele a plazmatické membrány parazita. Mezi membránami navíc zůstává zachován velký prostor. Pravděpodobně tedy nedochází k lokálnímu proražení plazmatické membrány hostitele, protože jinak by toto rané rozhraní bylo tvořené pouze jednou membránou (Sergey A. Karpov & Paskerova, 2020).

Ke změně rozhraní mezi buňkou parazita a hostitele dochází v okamžiku, kdy se protoplast dostane do trofického stádia zoosporangia. Mezi zoosporangiem a cytoplazmou hostitele se objevují tři membrány (Obr. 16) (Letcher, Longcore, et al., 2017). Vnitřní membrána odpovídá membráně parazita, zatímco dvě vnější hostitelské membrány slouží k lepšímu obalení a izolování parazita. Zároveň dochází ke zmenšování prostoru mezi jednotlivými membránami, dokud nejsou zcela přilehlé. Z cytoplazmy hostitelské buňky mohou být k rozhraní transportovány hostitelské mitochondrie, které pravděpodobně poskytují zoosporangiu energii ve formě ATP (Powell et al., 2017). Výjimku tvoří *R. polyphagi*, u kterého byla ve stádiu zoosporangia pozorována pouze jedna oddělovací membrána, která odpovídá membráně parazita. V některých případech je zoosporangium pokrýváno částmi endoplazmatického retikula, ale souvislé pokrytí hostitelskou membránou zatím nebylo pozorováno (Powell, 1984; Powell et al., 2017).



**Obr. 16** – Ukázka rozhraní mezi hostitelem a zoosporangiem tvořeného třemi membránami (znázorněné šipkami) (Powell et al., 2017); **H** – hostitel, **P** – parazit, **HM** – hostitelská mitochondrie

### 3.3 Hospodářský význam

Ekologická role zástupců rodu *Rozella* rozhodně není zanedbatelná. Parazitují hlavně na parazitech řas a hub, takže se jedná o sekundární konzumenty (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014). Jakožto paraziti výše zmíněných skupin mají vliv zejména na regulaci populační dynamiky fytoplanktonu a zooplanktonu vodních ploch. Svůj podíl mají tedy zástupci rodu *Rozella* i na regulaci hladiny CO<sub>2</sub> v ovzduší, neboť nepřímo ovlivňují denzitu primárních producentů. Parazitací na hostitelích rozkládajících detrit v půdě tak mají tito sekundární konzumenti vliv i na strukturu půdy (Gleason et al., 2012).

## 4 Microsporidia

Mikrosporidie představují skupinu eukaryotických, jednobuněčných, endobiotických a intracelulárních parazitů. Podle některých zdrojů je lze dokonce označit za intracytoplasmatické organismy, protože jediné rozhraní mezi parazitem a cytoplasmou hostitele představuje plazmatická membrána parazita (Vávra & Lukeš, 2013). Jednotlivé druhy mikrosporidií mohou parazitovat na zástupcích patřících do skupin protist přes bezobratlé až k obratlovcům včetně savců a člověka (Han & Weiss, 2017). Mikrosporidie lze nalézt v terestrických, marinních i sladkovodních ekosystémech (Han et al., 2020). První zástupce mikrosporidií, *Nosema bombycis*, byl objeven již před více než 160 lety (Cai et al., 2011) a do dnešní doby bylo popsáno více než 1 300 dalších druhů (P. Keeling, 2009).

Srovnání životních strategií afelidií, skupiny *Cryptomycota* a mikrosporidií se bude věnovat kapitola 5, avšak již teď lze prozradit, že životní cyklus a morfologie mikrosporidií jsou z výše zmíněných skupin nejodvozenější a nejpodivuhodnější. Možná právě proto se nad životním cyklem a způsobem invaze těchto organismů dodnes vznáší mnoho otazníků i přesto, že jim vědci neustále věnují svou pozornost a na toto téma již bylo napsáno mnoho odborných prací.

### 4.1 Stádia životního cyklu

Životní cyklus mikrosporidií je pro celou skupinu víceméně uniformní, až na některé rozdíly týkající se zejména počtu hostitelů, kteří v životním cyklu daného druhu figurují. S počtem hostitelů jsou spojené i různé typy spor, které mikrosporidie během životního cyklu vytvoří. Obecně lze říci, že životní cyklus mikrosporidií je velmi sofistikovaný a zaručí těmto organismům nepozorovaný vstup do hostitele, který je uchrání před hostitelským obranným systémem (Franzen, 2004).



### 4.1.1 Spora

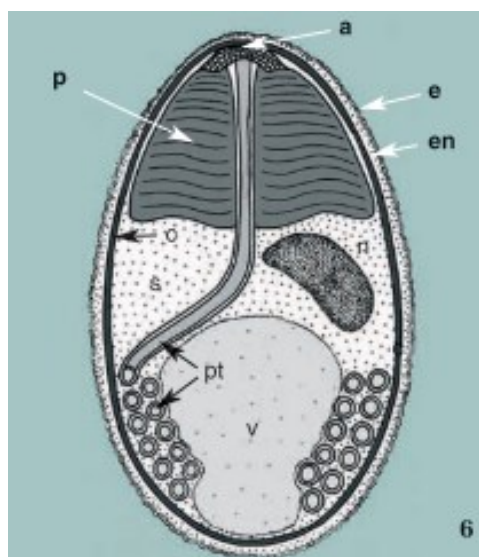
Nejvýznamnější strukturou životního cyklu mikrosporidií je spora (Obr. 17), která také slouží jako signifikantní prvek při klasifikaci jednotlivých druhů mikrosporidií (Vávra, 2017). Jedná se o jediné extracelulární, a tudíž i infekční stádium v životním cyklu mikrosporidií, které však není schopno aktivního pohybu (Franzen, 2005). Neschopnost aktivního pohybu mikrosporidie kompenzují tvorbou tenkostěnných spor, které klíčí spontánně záhy po jejich vzniku. Napomáhají tak infikovat vzdálenější tkáně, ve kterých pak ze sporoplasmy vznikají sekundární spory (Vávra, 2017).

Obsah spory, známý pod názvem sporoplazma, je obalen třemi vrstvami. Vrstva ohraničující sporoplazmu je plazmatická membrána parazita. Plazmatická membrána je obklopena chitinózní endosporickou vrstvou a vnější vrstvu pak tvoří exosporická proteinová vrstva. Tyto vrstvy se podílejí na udržení stálého tvaru spory a zaručují přežití spory v nepříznivých podmínkách (Cali & Takvorian, 2014). Součástí stěny spory jsou proteiny stěny spor, známé pod anglickou zkratkou SWPs. Proteiny exosporické vrstvy se mj. podílejí na interakci s okolním prostředím, zatímco proteiny endosporické vrstvy hrají roli v germinaci spory a interagují i s proteiny polární trubice (Li et al., 2012).

Nejen na povrchu, ale i uvnitř spory se nacházejí struktury, které se významně podílejí na germinaci a následné invazi do hostitelské buňky. Jednou z nich je polární trubice, která bude podrobněji probrána později v této kapitole. Polární trubice je v anteriorní oblasti sporoplazmy napojena na tzv. kotevní disk, který ji připevňuje k plazmatické membráně spory. Těsně pod kotevním diskem se kolem polární trubice nachází další struktura typická pro mikrosporidie – polaroplast. Jedná se o komplex lamel či váčků, který je odvozen buď od Golgiho aparátu, či od endoplazmatického retikula (Bigliardi & Sacchi, 2001; Weidner, 1970). V posteriorní části buňky se nachází vakuola, která je podobná posteriorním vakuolám afelidií a zástupcům skupiny Cryptomycota a je syntetizovaná činností Golgiho aparátu (Vávra & Larsson, 2014).

Velikost a uspořádání buněčného jádra se může během životního cyklu proměňovat a vyskytovat se ve dvou konformacích. Jednou z nich je tzv. monokaryon, solitérní, typicky eukaryotické jádro. Druhou, méně obvyklou konformací je tzv. diplokaryon - dvě jádra těsně přitisknutá k sobě. Výskyt určité konformace se odvíjí od daného druhu a některé druhy mohou během svého životního cyklu vystřídat obě (P. J. Keeling & Fast, 2002; Vávra & Larsson, 2014). Kolem jádra se vyskytuje endoplazmatické retikulum a ribosomy. Ribosomy v průběhu životního cyklu mění svou polohu a strukturně připomínají spíše prokaryotické ribosomy

(Bigliardi & Sacchi, 2001). Ve spoře lze také nalézt atypický Golgiho aparát (Beznoussenko et al., 2004).

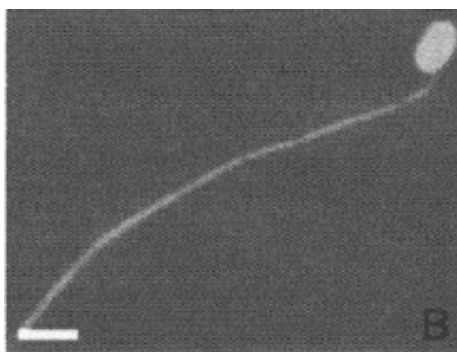


**Obr. 17** – Schéma ultrastruktury spory mikrosporidií (Vávra, 2017); **e** – vnější proteinový obal, **en** – vnitřní chitinózní obal, **c** – cytoplazmatická membrána, **s** – sporoplazma s rozptýlenými ribozomy, **n** – jádro, **a** – kotevní disk, **p** – lamelární polaroplast, **pt** – polární trubice, **v** – posteriorní vakuola

#### 4.1.1.1 Polární trubice

Polární trubice se vyskytuje u všech druhů mikrosporidií a je známá i pod názvy polární filament, injekční trubice či penetrační trubice (Obr.18). Hlavní složkou polární trubice jsou proteiny polární trubice (PTP). Těchto proteinů je napříč jednotlivými druhy známo pět, avšak v minulém roce byl u druhu *Nosema bombycis* nalezen i šestý, NbPTP6 (Lv et al., 2020). Hlavním proteinem je PTP1. Jedná se o O – manosylovaný protein bohatý na aminokyselinu prolin, jež mu zaručuje elasticitu. Manosylace je výhodná pro interakci s povrchem hostitelské buňky, neboť umožňuje vazbu na manózu vázající receptory na povrchu buňky. Protein PTP2 obsahuje velké množství lysinu. Leží na stejném chromozomu jako PTP1 a společně s ním často vytváří genový klastr (Xu & Weiss, 2005). Protein PTP3 pravděpodobně tvoří proteinový komplex s výše zmíněnými dvěma proteiny a nejspíše hraje roli v kontrole extruze polární trubice (Peu et al., 2002). Protein PTP4 je zřejmě důležitý ve zprostředkování kontaktu polární trubice s povrchem hostitelské buňky. Tento protein byl nalezen na samém konci polární trubice a je schopný navázat se na hostitelský transferinový receptor, TfR1, čímž umožňuje invazi sporoplazmy do hostitelské buňky (Han et al., 2017). Funkce proteinu PTP5, který se často vyskytuje v klastru s proteinem PTP4, stále nebyla zcela objasněna. Recentně objevený protein NbPTP6 pravděpodobně hraje roli v procesu infekce, neboť je schopný adherovat na povrch hostitelské buňky (Lv et al., 2020).

Polární trubici lze rozdělit na dva úseky – anteriorní, ve kterém je polární trubice napřímená, obklopená lamelami polaroplastu a přichycená ke kotvícímu disku. Druhý úsek je posteriorní, ve kterém je polární trubice stočená do závitů. Počet závitů se odvíjí podle délky trubice, která se různí napříč jednotlivými druhy a většinou se pohybuje od čtyř do třiceti obrátek (Xu & Weiss, 2005). Stočená polární trubice je vyplněná několika vrstvami elektronodenzního materiálu (Chioralia et al., 1997).



**Obr. 18** – Spora rodu *Encephalitozoon* s extrudovanou polární trubicí (Delbac & Polonais, 2008)

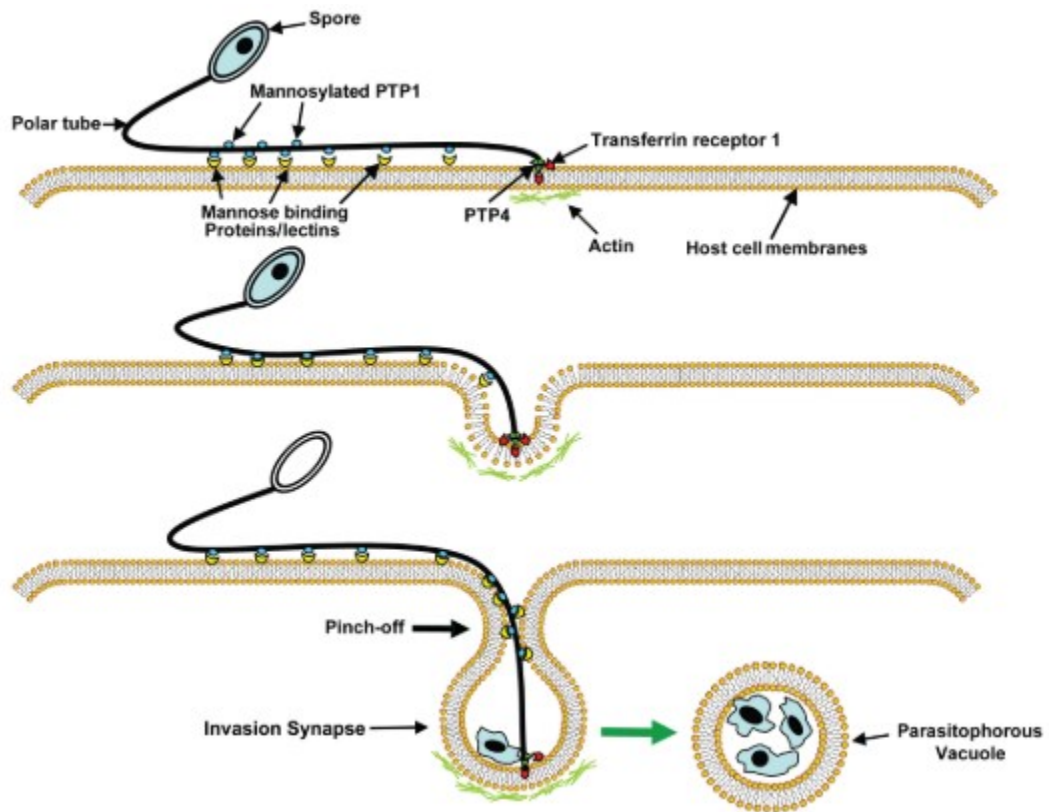
#### 4.1.2 Meront, sporont a sporoblast

Po injekci sporoplazmy do hostitelské buňky následuje intracelulární, trofická fáze merogonie. V této fázi parazit výrazně prolifereje a zaplní celou hostitelskou buňku. Následně může dojít k její hypertrofii. V tomto stádiu byla zaznamenána absence „klasického“ Golgiho aparátu. Merogonie může probíhat buď v přímém kontaktu s hostitelskou cytoplazmou, v parazitoforní vakuole či v nukleoplazmě hostitele, případně ještě v obalu vytvořeném z endoplasmatického retikula hostitele (Cali & Takvorian, 2014; Martinez et al., 1993). Je také velmi důležité zmínit, že na rozdíl od afelidií a rodu *Rozella* se zástupci mikrosporidií vyživují osmotrofně, stejně jako pravé houby (Corsaro et al., 2014). Stádium tohoto životního cyklu je napříč druhy velmi variabilní a může mít různorodý průběh. U některých druhů lze pozorovat tvorbu mnohojaderného plasmodia, které se následně rozdělí, u jiných lze pozorovat přímou tvorbu sporoblastů z merontů (Dunn & Smith, 2001). Po proběhnutí merogoniální fáze nastupuje fáze sporogoniální. Ve stádiu sporogonie dochází k tvorbě stěny kolem plazmatické membrány parazita. Sporonti se opětovně dělí a dávají vzniknout sporoblastům, přičemž počet dělení se odvíjí od daného druhu. Sporoblast je stádium, u kterého lze již vidět pevnou BS. Toto stádium poté prochází přeměnou a stane se z něj spora, která je schopna infikovat další tkáň či nového hostitele (Cali & Takvorian, 2014; Corsaro et al., 2019).

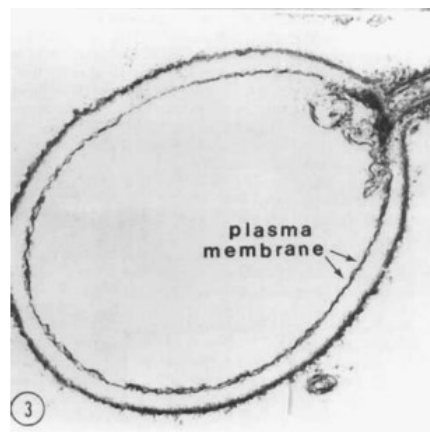
## 4.2 Invaze do hostitele

Invaze parazita začíná germinací spory. Zahájení germinace je ovlivněno několika faktory, které dosud nebyly plně objasněny. Ukázalo se, že aktivace spory je u většiny druhů závislá na přítomnosti vápníku (Magaud et al., 1996). Po aktivaci spory dochází ke zvýšení osmotického tlaku uvnitř spory. Hypotéz, jakými k tomuto jevu může dojít bylo navrženo mnoho, bohužel stále s určitostí nelze říct, která je správná. Jednou z nich je vtok vody do spory přes akvaporiny (Ghosh et al., 2006) či vytvořením protonového gradientu. Tento gradient pak zapříčiní osmotickou nestabilitu uvnitř spory a následný vtok vody do spory (Dall, 1983). U akvatických zástupců mikrosporidií byla vyřčena hypotéza zmiňující vliv degradace cukrů na zvýšení osmotického tlaku uvnitř spory. Konkrétně se jedná o disacharid trehalózu, který je ve velkém množství enzymem trehalázou štěpen na glukózu, čímž pravděpodobně dochází k dostatečnému zvýšení tlaku pro germinaci (Undeen & Vander Meer, 1994).

Extruzi penetrační trubice předchází vyklenutí apikální části spory, které způsobí ztenčení endosporového obalu. Oblast polaroplastu začne bobtnat a tlak uvnitř buňky vzrůstá natolik, že dochází ke vzniku praskliny v apikální části buňky a následnému explozivnímu vystřelení polární trubice, která se zároveň obrací naruby jako prst u rukavice (Lom, 1972). Samotné vystřelení polární trubice netrvá déle než dvě sekundy (Frixione et al., 1992). Současně dochází k bobtnání posteriorní vakuoly, která protlačuje obsah spory skrz polární trubici. Sporoplazma proniká polární trubicí a jako kapka se vynořuje na distálním konci trubice, kde chvíli setrvává (Han et al., 2017). Polární trubice interaguje s hostitelskou buňkou a vytváří invaginaci v plazmatické membráně hostitele označovanou pojmem invazní synapse (Obr. 19) (Sergey A. Karpov & Paskerova, 2020). Na vzniku této synapse se podílí proteiny polární trubice, proteiny na povrchu sporoplasmy a receptory na povrchu hostitelské buňky. Invazní synapse je pravděpodobně zásadní strukturou pro přežití sporoplasmy po transportu do cytoplazmy hostitele (Han et al., 2020). Sporoplazma také získává novou plazmatickou membránu, která je odvozena od polaroplastu, zatímco původní plazmatická membrána zůstává přitisknutá k obalu spory (Obr. 20) (Weidner et al., 1984).



**Obr. 19** – Schéma vzniku invazní synapse při infekci hostitele; lze také pozorovat interakci proteinů polární trubice s proteiny hostitelské BS (Han et al., 2020)



**Obr. 20** – Ukázka plazmatické membrány parazita, která po invazi zůstává skryta v prázdné spoře (Weidner et al., 1984)

Následujícím krokem je invaze parazita do hostitelské buňky. Existují dvě teorie navrhuující, jakým způsobem by k tomuto procesu mohlo dojít. Podle první (a také starší) teorie polární trubice penetruje hostitelskou plazmatickou membránu v synapsi, čímž dojde k přímému kontaktu sporoplazmy s cytoplazmou. V druhém případě interaguje sporoplazma s hostitelskou plazmatickou membránou a indukuje tak vznik parazitoforní

vakuoly a od hostitelské membrány je tedy oddělena membránou. S parazitoforní vakuolou jsou v blízkém kontaktu mitochondrie hostitele. V místě rozhraní membrán se koncentrují napětím ovládané iontové kanály, které kontrolují přenos makroergních sloučenin z hostitele do parazita (Han et al., 2019; Sergey A. Karpov & Paskerova, 2020). Neaktivované spory mohou být fagocytovány hostitelem a vystřelit polární trubici až po fagocytóze.

Sporoplasma poté přechází do již zmíněných stádií meronta, sporonta a sporoblastu, ze kterých posléze vznikají zralé spory. Následným klíčením těchto spor se mikrosporidie šíří buď uvnitř buněk daného hostitele, nebo napříč hostiteli – v druhém případě jsou spory vyloučeny z původního hostitele a do trávicí soustavy nového hostitele se dostávají nejčastěji orální cestou (Vávra & Lukeš, 2013).

### 4.3 Hospodářský význam

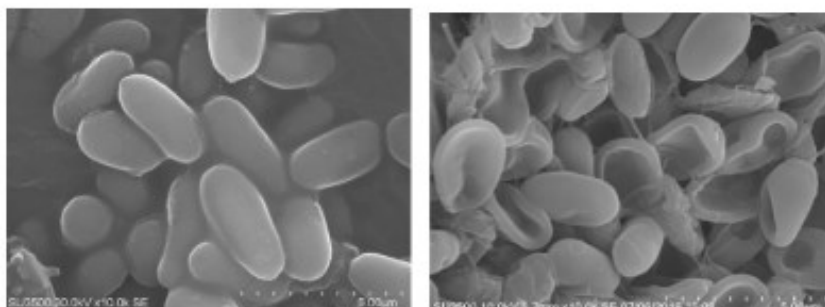
Mikrosporidie jsou z ekonomického hlediska velmi sledovanými organismy, neboť mohou způsobovat výrazné hospodářské škody. Některé druhy mikrosporidií jsou však člověkem využívány v jeho prospěch. Dva druhy rodu *Nosema*, a to *Nosema locustace* a *Nosema pyrausta* se používají jako biologické pesticidy proti bezobratlým škůdcům (Tamim et al., 2020; Vávra, 2017). Vědecká komunita přišla v posledním roce se zjištěním, že vertikálně přenášené mikrosporidie vyskytující se ve střevě komára *Anopheles* by mohly bránit přenosu prvoka *Plasmodium falciparum*, který přenáší tropickou nemoc malárii (Herren et al., 2020).

Bohužel je však pozorováno více příkladů, kdy mikrosporidie způsobují velké ekonomické ztráty. Již v devatenáctém století kvůli infekci mikrosporidii došlo ke kolapsu evropského hedvábnictví. Housenky bource morušového byly napadeny sporymi druhu *Nosema bombycis* a vyskytla se u nich nemoc zvaná pepřovka, která se velmi rychle šířila (Cai et al., 2011; Vávra, 2017). Dalším nebezpečným patogenem bezobratlých jsou hmyzomorky – *Nosema apis* a *Nosema ceranae*, které napadají trávicí soustavu včel a způsobují masové úhyny včelstev (Botías et al., 2013). Mezi často napadané bezobratlé patří také krevety a velké škody mikrosporidie způsobují i v průmyslových chovech ryb. Případy parazitace byly zaznamenány i na modelovém organismu *Danio rerio* (Vávra, 2017).

Mikrosporidiióza se nevyhýbá ani člověku. V lidském těle jsou nejčastěji nalézáni zástupci rodů *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon*, kteří ve zdravém těle figurují jako neškodní komenzálové. Nákaza imunosuprimovaných pacientů se ale projevuje závažnými střevními obtížemi a např. u HIV pozitivních osob může skončit až fatálně (Sak et al., 2011).

Tým čínských vědců však objevil způsob, jak regulovat mikrosporidiální infekce a tudíž snížit ekonomické škody. Bylo zjištěno, že stříbrné nanočástice jsou schopny narušovat

stěnu spory a zamezit germinaci u zástupců *Nosema bombycis* (Obr. 21). Tato metoda má velký potenciál, neboť stříbrné nanočástice se úspěšně využívají v boji proti mnohým patogenům (Dong et al., 2021).



**Obr. 21** – Snímky z elektronového mikroskopu znázorňující změnu morfologie mikrosporidií před použitím stříbrných nanočástic (vlevo) a 30 minut po jejich aplikaci (vpravo) (Dong et al., 2021)

## 5 Porovnání skupin Aphelida, Cryptomycota a Microsporidia

Afelidie, zástupci skupiny Cryptomycota i mikrosporidie jsou organismy, které mají nejspíše společný evoluční původ. O tom svědčí i fakt, že byly v minulosti řazeny do skupiny Opisthosporidia (Park & Poulin, 2021). Toto zařazení se dnes ale kvůli fylogenetickým nejasnostem používá hlavně pro výukové účely, neboť se nejspíše jedná o parafyletickou skupinu. S jistotou však lze říct, že tyto skupiny sdílí část své evoluční historie se skupinami říše Fungi a v současné době se vedou diskuze, zda se jedná o bazální skupinu této říše či spíše o její sesterskou skupinu (Han et al., 2020; James et al., 2020).

Zatímco vztah mezi skupinami Cryptomycota a Microsporidia je bohatě prozkoumaný, není zřejmé, jestli se afelidie odštěpily ve fylogenetickém stromu dříve či až po oddělení těchto skupin. Transkriptom rodu *Paraphelidium* ale naznačuje, že genom afelidií se více podobá genomu volně žijících hub. Skupiny Cryptomycota a Microsporidia jsou tak pravděpodobně více odvozené (James et al., 2020; Letcher et al., 2015). I přesto skupiny Aphelida a Cryptomycota sdílí několik společných znaků. Mezi ně patří fagotrofní způsob výživy, existence jednobíčíkatých, pohyblivých zoospor a fakt, že penetrační trubice zástupců těchto skupin je odvozena od stěny encystované spory (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014; Vávra, 2017). Tyto charakteristiky u zástupců mikrosporidií nenalzáme.

Společnému původu skupin Cryptomycota a Microsporidia nasvědčuje několik faktů. Mezi jeden z nich patří absence typicky eukaryotického Golgiho aparátu (Powell et al., 2017) a blízkou příbuznost mezi výše zmíněnými skupinami podporují také fylogenetické analýzy RNA polymerázy II obou těchto skupin (Hirt et al., 1999; James et al., 2006).

Současná data ukazují, že mikrosporidie se možná odštěpily od skupiny Cryptomycota. Pak by později zmíněná skupina byla skupinou parafyletickou. Tuto teorii podporuje např. sekundární redukce mitochondriálních funkcí zástupců skupiny Cryptomycota i u mikrosporidií. Zástupci rodu *Rozella* postrádají komplex I nutný pro oxidativní fosforylaci a během jejich životního cyklu dochází k dočasnému potlačení funkce mitochondrie (James et al., 2013). U mikrosporidií se vyskytují ještě více redukované mitochondriální organely - mitosomy. U obou skupin se vyskytují proteiny napomáhající transportu hostitelských makroergních sloučenin. Tyto transportéry jsou prokaryotického původu a byly přejaty horizontálním genovým přenosem od bakterií. Energetický metabolismus afelidií naopak nevykazuje žádnou redukci i přesto, že afelidie jsou také vnitrobuněční parazité. Tento fakt přispívá k hypotéze, že afelidie jsou příbuznější samotné skupině Fungi (Haag et al., 2014; Timofeev et al., 2020).

Existuje několik faktorů, které komplikují snahu objasnit vztahy mezi afelidiemi, zástupci skupiny Cryptomycota, mikrosporidiemi a zástupci říší Fungi. Mezi Fungi patří organismy, které přijímají potravu osmotroficky a v jejich životním cyklu nenalzáme bičíkaté stádium (výjimku tvoří zástupci chytridiomycet) (Voigt & Kirk, 2011). Hypotéza zabývající se fagotrofním původem hub tvrdí, že předkové Fungi byli stejně jako afelidie a zástupci rodu *Rozella* fagotrofní a sekundárně přešli k osmotrofickému způsobu přijímání potravy (Torruella et al., 2015). Tím se však naskytuje otázka, proč se mikrosporidie, vyvinuvší se pravděpodobně ze skupiny Cryptomycota, spoléhají na osmotrofii, zatímco jejich předci pravděpodobně získávali potravu fagocytózou. Dalším zajímavým jevem je přítomnost bičíku u afelidií a zástupců rodu *Rozella*, zatímco u mikrosporidií bičík nenalzáme (Sergey A. Karpov, Mamkaeva, Aleoshin, et al., 2014; Voigt & Kirk, 2011). I tento jev by si zasloužil větší pozornost vědecké komunity.

Tomu, že mikrosporidie jsou velmi odvozenou skupinou, která mohla vzniknout odštěpením od skupiny Cryptomycota, napovídají kromě specifického invazního aparátu i jejich extrémně redukované genomy, pravděpodobně jedny z nejmenších mezi eukaryoty (P. J. Keeling et al., 2010).

Existují však i organismy, které značně komplikují snahu objasnit fylogenetické vztahy mezi skupinami Cryptomycota a Microsporidia. Jedním z nich je *Mitosporidium daphniae*. Byla u něj nalezena mikrosporidiální polární trubice, avšak v jeho genomu se vyskytují geny umožňující oxidativní fosforylaci, které jsou příznačné pro pravé houby (Haag et al., 2014). Obdobnou situaci lze pozorovat u organismu *Paramicrosporidium saccamoebae*, který je řazen do skupiny Cryptomycota. Přestože sdílí morfologické znaky s mikrosporidiemi, jeho genom



také obsahuje geny nezbytné pro oxidativní fosforylaci (Quandt et al., 2017). Předpokládalo se, že tyto organismy tvoří „přechodové formy“ mezi skupinami Cryptomycota a Microsporidia, avšak analýzy jejich genů tyto hypotézy vyvrátily.

## 6 Závěr

Cílem této práce bylo shrnout dostupné informace o způsobu invaze skupin Aphelida, Cryptomycota a Microsporidia. Prací, které se zabývají těmito třemi skupinami najednou je totiž velmi málo, přitom se jedná o skupiny s podobnou evoluční historií. Jejich nejdůležitější charakteristikou je však existence invazního aparátu, který nebyl nalezen téměř u žádné jiné skupiny. I přes to, že všechny skupiny byly objeveny a popsány již v 19. století, není jim věnována stejná pozornost. Prací pojednávajících o invazním aparátu mikrosporidií je oproti pracím zabývajícím se afelidiemi a zástupci skupiny Cryptomycota nepoměrně mnoho. To také komplikovalo strukturování práce a snahu jednotlivé kapitoly sjednotit.

Značné množství prací se zabývá porovnáním invaze skupin Aphelida a Cryptomycota, avšak většinou pouze z morfologického hlediska. Stejně tak lze najít velké množství prací, které se zabývají příbuzností skupin Cryptomycota a Microsporidia, ale už nevěnují pozornost porovnání způsobu invaze. Nepoměr v množství informací, ať už o způsobu invaze, či o fylogenezi dané skupiny je nejspíše způsoben nepoměrem v počtu vědeckých skupin, které se daným skupinám parazitů věnují. I proto jsem se snažila poskytnout čtenáři ucelený přehled o těchto skupinách takovým způsobem, aby množství informací o jedné ze skupin nepřevyšovalo množství informací o těch zbylých. Důsledkem byl částečně zjednodušený popis penetračního aparátu mikrosporidií, neboť u afelidií či u rodu *Rozella* není známé podrobné proteinové složení penetrační trubice a ostatní fyziologické mechanismy umožňující parazitům interakci a následnou invazi do hostitele. V rámci srozumitelnosti došlo také k částečnému vynechání popisu invaze u organismů rodu *Mitosporidium* a *Paramicrosporidium*.

Za důležité jsem také považovala zmínit hostitelskou specifitu těchto parazitů a jejich případný dopad na člověka a okolí, které ho obklopuje. I přesto, že tyto organismy jsou ve většině případů pro společnost neznámé, jedná se o organismy podstatné zejména z důvodu lidské a veterinární medicíny, produkci biopaliv či ekologie mikroorganismů.

Invaznímu aparátu mikrosporidií je věnováno mnoho pozornosti, stejně tak jejich fylogenezi. Velká pozornost je věnována i evoluční historii afelidií a zástupců skupiny Cryptomycota, avšak detaily o jejich invazi z hlediska molekulárních mechanismů stále čekají na podrobnější objasnění.

## 7 Seznam použité literatury

- Barr, D. J. S., & Bandoni, R. (1979). A new species of *Rozella* on a Basidiomycete. *Mycologia*, 71(6), 1261–1264.
- Bass, D., Czech, L., Williams, B. A. P., Berney, C., Dunthorn, M., Mahé, F., Torruella, G., Stentiford, G. D., & Williams, T. A. (2018). Clarifying the relationships between Microsporidia and Cryptomycota. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(6), 773–782.
- Berbee, M. L., James, T. Y., & Strullu-Derrien, C. (2017). Early diverging fungi: diversity and impact at the dawn of terrestrial life. *Annual Review of Microbiology*, 71, 41–60.
- Beznoussenko, G. V, Dolgikh, V. V, Seliverstova, E. V, Semenov, P. B., Tokarev, Y. S., Trucco, A., Micaroni, M., Giandomenico, D. Di, Auinger, P., Senderskiy, I. V, Skarlato, S. O., Snigirevskaya, E. S., Komissarchik, Y. Y., Pavelka, M., Matteis, M. A. De, Luini, A., Sokolova, Y. Y., & Mironov, A. A. (2004). Analogs of the Golgi complex in microsporidia : structure and vesicular mechanisms of function. *Journal of Cell Science*, 120(7), 1288–1298.
- Bigliardi, E., & Sacchi, L. (2001). Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infections*, 3(5), 373–379.
- Blackwell, W. H., Letcher, P. M., & Powell, M. J. (2019). Review of *Nucleophaga* (a primitive, ‘cryptomycotan’ genus): Summary of named and unnamed species, with discussion of contemporary and historical observations. *Phytologia*, 101(1), 1–17.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., & Higes, M. (2013). *Nosema* spp . infection and its negative effects on honey bees ( *Apis mellifera iberiensis* ) at the colony level colony level. *Veterinary Research*, 44, 1–14.
- Cai, S., Lu, X., & Qiu, H. (2011). Identification of a *Nosema bombycis* ( Microsporidia ) spore wall protein corresponding to spore phagocytosis. *Parasitology*, 138(9), 1102–1109.
- Cali, A., & Takvorian, P. M. (2014). Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition* (pp. 71–133).
- Cavalier-Smith, T. (2013). Early evolution of eukaryote feeding modes , cell structural diversity , and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. *European Journal of Protistology*, 49(2), 115–178.
- Chioralia, G., Trammer, T., Maier, W. A., & Seitz, H. M. (1997). Morphologic changes in *Nosema algerae* (Microspora) during extrusion. *Parasitology Research*, 84, 123–131.
- Corsaro, D., Michel, R., Walochnik, J., Venditti, D., Müller, K. D., Hauröder, B., & Wylezich, C. (2016). Molecular identification of *Nucleophaga terricolae* sp. nov.

- (Rozellomycota), and new insights on the origin of the Microsporidia. *Parasitology Research*, 115(8), 3003–3011. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5055-9>
- Corsaro, D., Walochnik, J., Venditti, D., Steinmann, J., Müller, K. D., & Michel, R. (2014). Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage Rozellomycota. *Parasitology Research*, 113(5), 1909–1918.
- Corsaro, D., Wylezich, C., Venditti, D., Michel, R., Walochnik, J., & Wegensteiner, R. (2019). Filling gaps in the microsporidian tree: rDNA phylogeny of *Chytridiopsis typographi* (Microsporidia: Chytridiopsida). *Parasitology Research*, 118(1), 169–180.
- Dall, D. J. (1983). A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the microspora. *Journal of Theoretical Biology*, 105(4), 647–659.
- Delbac, F., & Polonais, V. (2008). The microsporidian polar tube and its role in invasion. In *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion. Subcellular Biochemistry* (pp. 208–220).
- Dong, Z., Wu, Q., Long, J., Lu, B., Zheng, N., Hu, C., Chen, P., Hu, N., Lu, C., & Pan, M. (2021). Silver nanoparticles are effective in controlling microsporidia. *Materials Science & Engineering C*, 125.
- Dunn, A. M., & Smith, J. E. (2001). Microsporidian life cycles and diversity : the relationship between virulence and transmission. *Microbes and Infections*, 3(5), 381–388.
- Franzen, C. (2004). Microsporidia : how can they invade other cells ? *Trends in Parasitology*, 20(6), 4–8.
- Franzen, C. (2005). How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitologica*, 52(1–2), 36–40.
- Frixione, E., Ruiz, L., Santillan, M., Vargas, L. V. De, Tejero, J. M., & Undeen, A. H. (1992). Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 22(1), 38–50.
- Ghosh, K., Cappiello, C. D., McBride, S. M., Occi, J. L., Cali, A., Takvorian, P. M., McDonald, T. V., & Weiss, L. M. (2006). Functional characterization of a putative aquaporin from *Encephalitozoon cuniculi*, a microsporidia pathogenic to humans. *International Journal for Parasitology*, 36(1), 57–62.
- Gleason, F. H., Carney, L. T., Lilje, O., & Glockling, S. L. (2012). Ecological potentials of species of Rozella (Cryptomycota). *Fungal Ecology*, 5(6), 651–656.
- Gleason, F. H., Lilje, O., Marano, A. V., Sime-Ngando, T., Sullivan, B. K., Kirchmair, M., & Neuhauser, S. (2014). Ecological functions of zoosporic hyperparasites. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–11.
- Greenwell, H. C., Laurens, L. M. L., Shields, R. J., Lovitt, R. W., & Flynn, K. J. (2010).

- Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(46), 703–726.
- Haag, K. L., James, T. Y., Pombert, J. F., Larsson, R., Schaer, T. M. M., Refardt, D., & Ebert, D. (2014). Evolution of a morphological novelty occurred before genome compaction in a lineage of extreme parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(43), 15480–15485.
- Han, B., Ma, Y., Tu, V., Tomita, T., Mayoral, J., Williams, T., Horta, A., Huang, H., & Weiss, L. M. (2019). Microsporidia interact with host cell mitochondria via voltage-dependent anion channels using sporoplasm surface protein 1. *MBio*, 10(4), 1–24.
- Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P. M., Cali, A., Maier, K., Long, M., Levy, M., Tanowitz, H. B., Pan, G., Delbac, F., Zhou, Z., & Weiss, L. M. (2017). The role of microsporidian polar tube protein 4 ( PTP4 ) in host cell infection. *PLOS Pathogens*, 4, 1–28.
- Han, B., Takvorian, P. M., Weiss, L. M., & Dean, P. (2020). Invasion of host cells by microsporidia. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–16.
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(2), 1–17.
- Held, A. A. (1973). Encystment and germination of the parasitic chytrid *Rozella allomyces* on host hyphae. *Canadian Journal of Botany*, 51(10), 1825–1835.
- Held, A. A. (1974). Attraction and attachment of zoospores of the parasitic chytrid *Rozella allomyces* in response to host-dependent factors. *Archives of Microbiology*, 95(1), 97–114.
- Held, A. A. (1980). Development of *Rozella* in *Allomyces* : a single zoospore produces numerous zoosporangia and resistant sporangia. *Canadian Journal of Botany*, 58(8), 959–979.
- Held, A. A. (1981). *Rozella* and *Rozellopsis*: naked endoparasitic fungi which dress-up as their hosts. *The Botanical Review*, 47(4), 451–515.
- Herren, J. K., Mbaisi, L., Mararo, E., Makhulu, E. E., Mobegi, V. A., Butungi, H., Mancini, M. V., Oundo, J. W., Teal, E. T., Pinaud, S., Lawniczak, M. K. N., Jabara, J., Nattoh, G., & Sinkins, S. P. (2020). A microsporidian impairs *Plasmodium falciparum* transmission in *Anopheles arabiensis* mosquitoes. *Nature Communications*, 11, 1–10.
- Hirt, R. P., Logsdron Jr., J. M., Healy, B., Dorey, M. W., Ford, D. W., & Embley, T. M. (1999). Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America*, 96, 580–585.
- James, T. Y., & Berbee, M. L. (2012). No jacket required - new fungal lineage defies dress code: recently described zoosporic fungi lack a cell wall during trophic phase. *BioEssays*, 34(2), 94–102.
- James, T. Y., Letcher, P. M., Longcore, J. E., Mozley-Standridge, S. E., Porter, D., Powell, M. J., Griffith, G. W., & Vilgalys, R. (2006). A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98(6), 860–871.
- James, T. Y., Pelin, A., Bonen, L., Ahrendt, S., Sain, D., Corradi, N., & Stajich, J. E. (2013). Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite Cryptomycota and Microsporidia. *Current Biology*, 23(16), 1548–1553.
- James, T. Y., Stajich, J. E., Hittinger, C. T., & Rokas, A. (2020). Toward a fully resolved fungal tree of life. *Annual Review of Microbiology*, 74, 291–313.
- Jones, M. D. M., Richards, T. A., Hawksworth, D. L., & Bass, D. (2011). Validation and justification of the phylum name Cryptomycota phyl. nov. *IMA Fungus*, 2(2), 173–175.
- Karpov, S.A., Mamkaeva, M. A., Moreira, D., & López-García, P. (2016). Molecular phylogeny of *Aphelidium tribonemae* reveals its sister relationship with *A. aff. melosirae* (Aphelida, Opisthosporidia). *Protistology*, 10(3), 97–103.
- Karpov, Sergey A., Cvetkova, V. S., Annenkova, N. V., & Vishnyakov, A. E. (2019). Kinetid structure of *Aphelidium* and *Paraphelidium* (Aphelida) suggests the features of the common ancestor of Fungi and Opisthosporidia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(6), 911–924.
- Karpov, Sergey A., Mamkaeva, M. A., Aleoshin, V. V., Nassonova, E., Lilje, O., & Gleason, F. H. (2014). Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthokonta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–11.
- Karpov, Sergey A., Mamkaeva, M. A., Benzerara, K., Moreira, D., & López-García, P. (2014). Molecular phylogeny and ultrastructure of *Aphelidium aff. melosirae* (Aphelida, Opisthosporidia). *Protist*, 165(4), 512–526.
- Karpov, Sergey A., Mikhailov, K. V., Mirzaeva, G. S., Mirabdullaev, I. M., Mamkaeva, K. A., Titova, N. N., & Aleoshin, V. V. (2013). Obligately phagotrophic aphelids turned out to branch with the earliest-diverging fungi. *Protist*, 164(2), 195–205.
- Karpov, Sergey A., & Paskerova, G. G. (2020). The aphelids, intracellular parasitoids of algae, consume the host cytoplasm “from the inside.” *Protistology*, 14(4), 258–263.

- Karpov, Sergey A., Tcvetkova, V. S., Mamkaeva, M. A., Torruella, G., Timpano, H., Moreira, D., Mamanazarova, K. S., & López-García, P. (2017). Morphological and Genetic Diversity of Opisthosporidia: New Aphelid *Paraphelidium tribonemae* gen. et sp. nov. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *64*(2), 204–212.
- Karpov, Sergey A., Torruella, G., Moreira, D., Mamkaeva, M. A., & López-García, P. (2017). Molecular phylogeny of *Paraphelidium letcheri* sp. nov. (Aphelida, Opisthosporidia). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *64*(5), 573–578.
- Karpov, Sergey A., Vishnyakov, A. E., López-García, P., Zorina, N. A., Ciobanu, M., Tcvetkova, V. S., & Moreira, D. (2020). Morphology and molecular phylogeny of *Aphelidium insulamus* sp. nov. (Aphelida, Opisthosporidia). *Protistology*, *14*(4), 191–203.
- Keeling, P. (2009). Five Questions about Microsporidia. *PLOS Pathogens*, *5*(9), 1–4.
- Keeling, P. J., Corradi, N., Morrison, H. G., Haag, K. L., Ebert, D., Weiss, L. M., Akiyoshi, D. E., & Tzipori, S. (2010). The reduced genome of the parasitic microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* lacks genes for core carbon metabolism. *Genome Biology and Evolution*, *2*, 304–309.
- Keeling, P. J., & Fast, N. M. (2002). MICROSPORIDIA : Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology*, *56*, 93–116.
- Lara, E., Moreira, D., & López-García, P. (2010). The environmental clade LKM11 and *Rozella* form the deepest branching clade of fungi. *Protist*, *161*(1), 116–121.
- Lazarus, K. L., & James, T. Y. (2015). Surveying the biodiversity of the Cryptomycota using a targeted PCR approach. *Fungal Ecology*, *14*, 62–70.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2014.11.004>
- Letcher, P. M., Longcore, J. E., James, T. Y., Leite, D. S., Simmons, D. R., & Powell, M. J. (2018). Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Rozella multimorpha*, a new species in Cryptomycota. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *65*(2), 180–190.
- Letcher, P. M., Longcore, J. E., Quandt, C. A., Leite, D. da S., James, T. Y., & Powell, M. J. (2017). Morphological, molecular, and ultrastructural characterization of *Rozella rhizoclosmatii*, a new species in Cryptomycota. *Fungal Biology*, *121*(1), 1–10.
- Letcher, P. M., Lopez, S., Schmieider, R., Lee, P. A., Behnke, C., Powell, M. J., & McBride, R. C. (2013). Characterization of *Amoebophilidium protococcarum*, an algal parasite new to the Cryptomycota isolated from an outdoor algal pond used for the production of biofuel. *PLoS ONE*, *8*(2), 1–15.
- Letcher, P. M., & Powell, M. J. (2018). A taxonomic summary and revision of *Rozella*

- (Cryptomycota). *IMA Fungus*, 9(2), 383–399.
- Letcher, P. M., & Powell, M. J. (2019). A taxonomic summary of *Aphelidiaceae*. *IMA Fungus*, 10, 1–11.
- Letcher, P. M., Powell, M. J., Lee, P. A., Lopez, S., & Burnett, M. (2017). Molecular phylogeny and ultrastructure of *Aphelidium desmodesmi*, a new species in Aphelida (Opisthosporidia). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(5), 655–667.
- Letcher, P. M., Powell, M. J., Lopez, S., Lee, P. A., & McBride, R. C. (2015). A new isolate of *Amoebophilidium protococcarum*, and *Amoebophilidium occidentale*, a new species in phylum Aphelida (Opisthosporidia). *Mycologia*, 107(3), 522–531.
- Li, Z., Pan, G., Li, T., Huang, W., Chen, J., Geng, L., Yang, D., Wang, L., & Zhou, Z. (2012). SWP5, a spore wall protein, interacts with polar tube proteins in the parasitic microsporidian *Nosema bombycis*. *Eukaryotic Cell*, 11(2), 229–237.
- Lom, J. (1972). On the Structure of the Extruded Microsporidian Polar Filament. *Zeitschrift Für Parasitenkunde*, 38(3), 200–213.
- Lv, Q., Wang, L., Fan, Y., Meng, X., Liu, K., Zhou, B., & Chen, J. (2020). Identification and characterization a novel polar tube protein (NbPTP6) from the microsporidian *Nosema bombycis*. *Parasites & Vectors*, 13, 1–9.
- Magaud, A., Achbarou, A., & Desportes-wage, I. (1996). Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(s6), 81.
- Martinez, M. A., Vivares, C. P., & Bouix, G. (1993). Ultrastructural study of *Endoreticulatus durforti* n. sp., a new microsporidian parasite of the intestinal epithelium of *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(5), 677–687.
- Moore, R. T., & McAlear, J. H. (1961). Fine structure of Mycota. 5. Lomasomes—Previously characterized hyphal structures. *Mycologia*, 53(2), 194–200.
- Park, E., & Poulin, R. (2021). Revisiting the phylogeny of microsporidia. *International Journal for Parasitology*.
- Peu, I., Peyret, P., Me, G., & Vi, C. P. (2002). The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 122(1), 69–80.
- Powell, M. J. (1984). Fine structure of the unwallled thallus of *Rozella polyphagi* in its host *Polyphagus euglenae*. *Mycologia*, 76(6), 1039–1048.
- Powell, M. J., & Letcher, P. M. (2019). Ultrastructure of early stages of *Rozella allomycis* (Cryptomycota) infection of its host, *Allomyces macrogynus* (Blastocladiomycota). *Fungal Biology*, 123(2), 109–116.



- Powell, M. J., Letcher, P. M., & James, T. Y. (2017). Ultrastructural characterization of the host–parasite interface between *Allomyces anomalus* (Blastocladiomycota) and *Rozella allomycis* (Cryptomycota). *Fungal Biology*, *121*(6–7), 561–572.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2017.03.002>
- Quandt, C. A., Beaudet, D., Corsaro, D., Walochnik, J., Michel, R., Corradi, N., & James, T. Y. (2017). The genome of an intranuclear parasite, *Paramicrosporidium saccamoebae*, reveals alternative adaptations to obligate intracellular parasitism. *ELife*, *6*, 1–19.
- Ryder, L. S., & Talbot, N. J. (2015). Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, *26*, 8–13.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.013>
- Sak, B., Brady, D., Kve, D., Rost, M., Kostka, M., Hu, Z., & Kva, M. (2011). Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(3), 1064–1070.
- Schweikert, M., & Schnepf, E. (1997). Electron microscopical observations on *Pseudaphelidium drebesii* Schweikert and Schnepf, a parasite of the centric diatom *Thalassiosira punctigera*. *Protoplasma*, *199*, 113–123.
- Seto, K., Matsuzawa, T., Kuno, H., & Kagami, M. (2020). Morphology, Ultrastructure, and Molecular Phylogeny of *Aphelidium collabens* sp. nov. (Aphelida), a Parasitoid of a Green Alga *Coccomyxa* sp. *Protist*, *171*, 125728.  
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2020.125728>
- Sparrow, F. K. (1938). Remarks on the genus *Rozella*. *Mycologia*, *30*(4), 375–378.
- Stajich, J. E., Berbee, M. L., Blackwell, M., Hibbett, D. S., James, T. Y., Spatafora, J. W., & Taylor, J. W. (2009). The Fungi. *Current Biology*, *19*(18), 840–845.
- Tamim, H., Jarkass, E., & Reinke, A. W. (2020). The ins and outs of host-microsporidia interactions during invasion, proliferation and exit. *Cellular Microbiology*, *22*(11), 1–12.
- Tcvetkova, V. S., Zorina, N. A., Mamkaeva, M. A., & Karpov, S. A. (2019). Molecular phylogeny of *Aphelidium arduennense* sp. nov. – new representative of Aphelida (Opisthosporidia). *Protistology*, *13*(4), 192–198.
- Timofeev, S., Tokarev, Y., & Dolgikh, V. (2020). Energy metabolism and its evolution in Microsporidia and allied taxa. *Parasitology Research*, *119*(5), 1433–1441.
- Torruella, G., De Mendoza, A., Grau-Bové, X., Antó, M., Chaplin, M. A., Del Campo, J., Eme, L., Pérez-Cordón, G., Whipps, C. M., Nichols, K. M., Paley, R., Roger, A. J., Sitjà-Bobadilla, A., Donachie, S., & Ruiz-Trillo, I. (2015). Phylogenomics reveals convergent evolution of lifestyles in close relatives of animals and fungi. *Current Biology*, *25*(18),

2404–2410.

- Torruella, G., Grau-Bové, X., Moreira, D., Karpov, S. A., Burns, J. A., Sebé-Pedrós, A., Völcker, E., & López-García, P. (2017). The aphelid-like phagotrophic origins of fungi. *BioRxiv*, 1–26.
- Torruella, G., Grau-Bové, X., Moreira, D., Karpov, S. A., Burns, J. A., Sebé-Pedrós, A., Völcker, E., & López-García, P. (2018). Global transcriptome analysis of the aphelid *Paraphelidium tribonemae* supports the phagotrophic origin of fungi. *Communications Biology*, 1(1), 1–11.
- Undeen, A. H., & Vander Meer, R. K. (1994). Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista: Microspora) spores: a quantitative study. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41(2), 129–132.
- Vávra, J. (2017). Mikrosporidie : houby , co nevypadají jako houby , aneb Sestry říše Fungi ? *Živa. Academia*, 65(5), 257–261.
- Vávra, J., & Larsson, R. J. I. (2014). Structure of the Microsporidia. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition* (pp. 1–70).
- Vávra, J., & Lukeš, J. (2013). Microsporidia and “The Art of Living Together.” In *Advances in Para* (Vol. 82). Elsevier.
- Voigt, K., & Kirk, P. M. (2011). Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. *Applied Microbiology and Technology*, 90, 41–57.
- Weidner, E. (1970). Ultrastructural study of microsporidian development. *Cell and Tissue Research*, 54, 33–54.
- Weidner, E., Byrd, W., Scarborough, A., Pleshinger, J., & Sibley, D. (1984). Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle membrane into plasma membrane. *The Journal of Protozoology*, 31(2), 195–198.
- Xu, Y., & Weiss, L. M. (2005). The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *International Journal for Parasitology*, 35(9), 941–953.