

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Petr Táborský

Evolvece mastigontu ve skupině Excavata
Evolution of mastigont in Excavata

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2011

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, 4. 5. 2011

Podpis

| | |
|---|----|
| ABSTRAKT..... | 2 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| I. ÚVOD..... | 3 |
| II. HISTORIE ZKOUMÁNÍ EXKAVÁT (OD SKUPINY ARCHEZOA PO EXCAVATA V DNEŠNÍ PODOBĚ)..... | 3 |
| III. FYLOGENEZE EXKAVÁT..... | 6 |
| IV. POPIS CYTOSKELETU EXKAVÁT..... | 8 |
| V. DIVERZITA A ZÁNİK EXKAVÁTNÍCH ZNAKŮ V JEDNOTLIVÝCH LINÍCH..... | 13 |
| 5.1. MALAWIMONAS..... | 13 |
| 5.2. DISCOBA..... | 13 |
| 5.2.1. JAKOBIDA..... | 13 |
| 5.2.2. HETEROLOBOSEA..... | 14 |
| 5.2.3. EUGLENOZOA..... | 15 |
| 5.2.4. TSUKUBAMONAS GLOBOSA..... | 17 |
| 5.3. METAMONADA..... | 18 |
| 5.3.1. PREAXOSTYLA..... | 18 |
| 5.3.2. PARABASALIA..... | 20 |
| 5.3.3. FORNICATA..... | 22 |
| VI. ZÁVĚR..... | 23 |
| SEZNAM ZKRATEK:..... | 24 |
| VII. POUŽITÁ LITERATURA:..... | 24 |

Abstrakt

Až v poslední době dochází k odhalení obrovské rozmanitosti eukaryotických organizmů. Jednou z velkých skupin jsou Excavata. Zkoumání organizmů této skupiny je velmi důležité jak z teoretického, tak z praktického hlediska. Mnoho autorů se domnívá, že v této skupině leží kořen eukaryot, a svědčí pro to mnohé studie. Náleží sem i organizmy, které mají nejméně odvozený mitochondriální genom. Několik zástupců ze skupiny Excavata jsou významní lidsí patogeni.

V první části se práce věnuje historickému přehledu utváření taxonomické skupiny Excavata, včetně pojednání o skupině Archezoa. V další části se soustřeďuje na obecný popis mastigontu (bazální tělíčka a s nimi spojený cytoskelet z mikrotubulárních i nemikrotubulárních struktur). V poslední části se práce zabývá popisem mastigontu u různě odvozených organizmů ze skupiny Excavata, které mohou být jak volně žijící, tak endobitické.

Klíčová slova: Excavata, ultrastruktura, mastigont, Archezoa, exkavátní znaky

Abstract

In recent years we have been discovering a huge diversity of eukaryotic organisms. One of the big super-groups is Excavata. Examination of the organisms from this group is fairly important as far as theoretical and practical reasons are concerned. A significant number of authors believe that there is the root of all eukaryotic organisms in this group. And what is more, a lot of studies prove the point. Within Excavata group we can find the organisms with the most primitive mitochondrial genome which is known. Several other representatives are an important human pathogenes.

In the first part of the thesis I focus on the historical review of the creation of the super-group Excavata and I also include a part regarding the theory about Archezoa. The next section deals with the general description of mastigont (basal bodies and cytoskeleton that is associated with them). The last part presents mastigont descriptions of some derived representatives of Excavata. Some of these organisms may be free-living and some live inside other organisms.

Key words: Excavata, ultrastructure, mastigont, Archezoa, excavata features

I. Úvod

Excavata (Cavalier-Smith, 2002; Simpson 2003) je poměrně velká skupina eukaryotických organismů. Fylogenetická pozice mnoha jejích zástupců byla dříve nejasná (Patterson, 1999). Organismy této skupiny byly postupně seskupovány pomocí morfologických dat (Flavin a Nerad, 1993; O'Kelly, 1993; Simpson a Patterson, 1999), ale organismy, které druhotně ztratily některé morfologické znaky, sem mohly být přiřazeny až pomocí molekulárních dat (Embley a Hirt, 1998; Dacks et al., 2001). I po několika letech výzkumu však stále monofylie této skupiny zůstává nejistá. Jedna z nejnovějších studií tuto monofylii spíše podporuje, než vyvrací (Hampl et al., 2009).

Studium skupiny Excavata je významné z medicínského hlediska, protože sem patří mnoho lidských patogenů, jako *Giardia intestinalis*, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Naegleria fowleri*, *Trichomonas vaginalis*. Dalším důvodem výzkumu skupiny je několikanásobný nezávislý vznik anaerobního způsobu života (např. Metamonada, Symbiontida, Psalteriomoandidae, *Andalucia*) a s ním spojený vznik hydrogenosomů a mitosomů. Zájem o Excavata také vyvolává možnost, že by někde v této skupině mohl ležet kořen eukaryot, jak se domnívá např. Cavalier-Smith (2010), který předpokládá, že kořen eukaryot leží mezi skupinou Euglenozoa a zbytkem eukaryot. Usuzuje tak z nepřítomnosti přenašeče TOM 40 na vnější mitochondriální membráně, přičemž u dalších organismů je přítomen a jeho ztráta je letální. Dalším důvodem, proč se domnívat, že Excavata leží blízko eukaryotického kořene, je nejméně odvozený mitochondriální genom u některých zástupců, např. *Reclinomonas americana* (Lang et al., 1997).

Mnoho příbuzenských vztahů mezi zástupci exkavát není ještě řádně vyřešeno, a proto bude důležité tuto skupinu dále zkoumat, a to jak na morfologické, tak i na molekulární úrovni.

II. Historie zkoumání exkavát (Od skupiny Archezoa po Excavata v dnešní podobě)

Zkoumání tohoto taxonu je plné pochybností, zvrátů a překvapivých objevů. Skupina Excavata byla ustanovena jako jedna z dnešních tzv. eukaryotických superskupin, v roce 2002 (Cavalier-Smith). Už dříve však byly návrhy, sdružující některé taxony, které jsou dnes řazeny do superskupiny Excavata. Zprvu byli zástupci do této skupiny přidáváni hlavně na základě morfologických dat, kterých bylo více než dat z molekulárních studií.

Mnoho zástupců skupiny Excavata je neoddělitelně spojeno s teorií Archezoa. Podle této teorie se někteří prvoci odštěpili od zbytku eukaryot ještě před endosymbiotickým vznikem mitochondrie (Cavalier-Smith, 1983). Archezoa byla v původním pojetí tvořena skupinami Metamonada, Parabasalia, Archamoebae a Microsporidia. Pro existenci této skupiny svědčil také „primitivní“ vzhled většiny zástupců, tj. absence některých organel, jako např. „stacked“ Golgiho aparátu, mitochondrií a microbodies (peroxisomů). Dále získávala Archezoa větší podporu pomocí molekulární fylogenetiky, hlavně zkoumáním genu pro SSU rRNA. Podle těchto dat se někteří zástupci odvětovali na bázi eukaryotického stromu, jako třeba *Giardia intestinalis* (Sogin, 1989). Zástupci ze skupiny Archezoa se začali poměrně podrobně studovat, ale postupem času se začaly objevovat důkazy, které tuto teorii vyvracely. Bylo to objevení mitochondriálních genů pro proteiny hsp70, cpn60 a dalších (Bui et al., 1996; Roger et al., 1998), poukázání na problém přitahování dlouhých větví (Stiller a Hall, 1999). Fylogenetické analýzy genu pro SSU rRNA ukázaly, že zástupci skupiny Archamoebae (*Entamoeba histolytica*, *Mastigamoeba balamuthi*) se na fylogenetických stromech odvětvují až po organizmech, které mitochondrie mají, a tím pádem nemohou spadat do skupiny Archezoa (Sogin, 1989; Hinkle et al., 1994). Další ranou teorii archezoa bylo určení mikrosporidií jako korunové skupiny hub (Fungi). Jejich primitivní vzhled je tedy nejpravděpodobněji výsledkem jejich parazitického způsobu života, a ne primitivního původu (Hirt et al., 1999). Teorie archezoa přestávala být dominantní (viz. Roger, 1999). Dnes známe ve všech původních archezoích deriváty mitochondrie (mitosomy, hydrogenosomy). Pro teorii archezoa dnes nehovoří žádné důkazy, ale to neznamená, že nějací zástupci archezoí nemohli existovat, buď jsme je ještě neobjevili, nebo nepřežili do dnešních dnů. Dnes můžeme prohlásit, že žádná ze skupin vyhlášených Cavalier-Smithem (1983) za Archezoa, není pravým zástupcem skupiny Archezoa.

O'Kelly (1993) se jako jeden z prvních ve své studii zabíral morfologickými podobnostmi mezi některými organizmy, většinou patřícími do skupiny později označované jako Excavata. Autor zde zavádí pojem „jakobids“ – jakobidi, který označuje skupinu sdružující rody *Reclinomonas*, *Histiona* a *Jakoba*. V těchto rodech se vyskytují mitochondrie se všemi typy krist (tubulárními, plochými i diskovitými). Skupinu jakobidů definuje O'Kelly hlavně na základě morfologických dat, především pomocí znaků na cytoskeletu. Poukazuje na možnou příbuznost jakobidů, kteří mají mitochondrie, a amitochondriálních metamonád a opět tak usuzuje na základě morfologických znaků. Všimá si podobnosti mezi zreplikovaným aparátem bičíku u jakobidů a aparátem bičíku u interfázních buněk metamonád, dále podobné velikosti bazálních tělísek a srovnatelné přechodové zóny bičíku,

také podobných ploutviček na bičíku. Jakobidy nepovažuje přímo za metamonády, ale za jejich sesterskou skupinu. Dále provádí srovnání jakobidů a heteroloboseí, což jsou oproti metamonádám povětšinou organizmy s typickými mitochondriemi. U heteroloboseí poukazuje opět na přechodovou zónu bičíku, na stavbu mikrotubulárních kořenů a dorzálního vějíře mikrotubulů. Příbuznost jakobidů s heteroloboseí a vzdáleně i s metamonádami se později potvrdila, avšak autor uvádí i podobnost s prvokem rodu *Colponema* (Myl'nikova a Myl'nikov, 2010) a tvrdí, že tento alveolát (Adl et al., 2005) mohl mít předka, který se vyvinul z jakobida s tubulárními kristami. O'Kelly ještě zkouší doložit příbuznost jakobidů a zelených řas pomocí dvou znaků, což by měly být tubulární mitochondriální kristy a struktura, připomínající C fibrilu, cytoskeletární element typický pro typické exkaváty (dle O'Kellyho MLS – „multi layer structure“). Předek zelených řas by byl podle něj odvozený od jakobida s tubulárními kristami. K této variantě bych ale byl velmi skeptický. Zřejmě se jedná pouze o konvergentní evoluci. Dnes je známo, že zelené řasy (Viridiplantae) patří do říše Archaeplastida, a nejsou tedy jakobidům blíže příbuzné (Adl et al, 2005).

Patterson et al. (1999) si všimli morfologických podobností u organismů, které v době vzniku práce neměly známou mitochondrii (*Chilomastix cuspidata*, *Trimastix marina*, *Carpediemonas membranifera*) a mitochondriálních jakobidů. Byla zkoumána ultrastruktura některých dalších organismů a postupně byla vytvořena „exkavátní hypotéza“ (Simpson a Patterson, 1999). Organizmy, které tato hypotéza sdružuje, mají břišní rýhu, která je asociována se zpětným bičíkem. Tento bičík vytváří svým pohybem proud vody, díky kterému jsou do břišní rýhy naháněny bakterie, jimiž se tyto organizmy živí. S bičíkem a břišní rýhou jsou asociovány další mikrotubulární i nemikrotubulární struktury. Autoři sdružili tyto organizmy (retortamonády, diplomonády, některá Heterolobosea, jakobidi, *Trimastix*, *Carpediemonas*) do nového hypotetického taxonu, který nazvali „exkavátní taxon“. Exkavátní hypotéza tvrdí, že břišní rýha těchto organismů je homologická struktura a všechny tyto organizmy měly společného předka. Autoři však nevyklučují ani to, že je tato skupina parafyletická a že „typickým“ exkavátům jsou příbuzné i další organizmy, které břišní rýhu nemají. Následujícím krokem ve vývoji chápání této skupiny skutečně bylo přiřazení dalších organismů, které obvykle postrádají břišní rýhu a jejich příbuznost s typickými exkaváty byla objasněna až díky molekulárním datům. Velkým převratem v tomto směru bylo určení blízké příbuznosti volně žijících organismů rodu *Trimastix* a endobiotických oxymonád, které nemají exkavátní znaky, byly řazeny mezi metamonády a u kterých nebyla pozorována mitochondrie. *Trimastix* však má organelu se dvěma obalovými membránami, která je zřejmě odvozená od mitochondrie (Dacks et al., 2001), proto je téměř jisté, že oxymonády jsou

amitochondriální až sekundárně (Dacks et al., 2001). Později byla ustanovena skupina Preaxostyla, která zahrnuje právě rod *Trimastix* a oxymonády (Simpson, 2003).

Další skupina, která byla přiřazena k exkavátům, jsou Euglenozoa. Jejich předpokládaná příbuznost se skupinou Heterolobosea (Cavalier-Smith, 1998) byla potvrzena molekulárně-fylogenetickou studií (Silberman et al., 2002). Cavalier-Smith (1998) tyto dva taxony sdružuje do skupiny Discicristata dle charakteristického tvaru mitochondriálních krist.

Na základě předchozích morfologických a molekulárních studií Cavalier-Smith (2002) poprvé používá formální název Excavata a dává tomuto taxonu status infraříše. Za plesiomorfni znaky této skupiny považuje dorzální mikrotubulární kořen, který podporuje dorzální stranu buňky, a dva ventrální mikrotubulární kořeny. Ale dále svoji definici příliš nerozvádí. Proto Simpson o rok později (2003) ve studii, která se zabývá jak ultrastrukturou, tak i molekulární fylogenetikou, určuje osm synapomorfii skupiny Excavata:

- břišní rýha
- I fibrila
- B fibrila
- C fibrila
- rozvětvený pravý mikrotubulární kořen
- „singlet root“
- ploutvičky na bičíku,
- „composite fibre“ (složená fibrila)

Zástupce skupiny Excavata rozdělují na typické exkaváty (mají všechny exkavátní znaky) a netypické exkaváty (ztráta některých nebo všech exkavátních znaků) (Simpson, 2003).

Po vytvoření systému šesti říší (dnes pěti) se Excavata stala jednou z nich (Simpson a Roger, 2004 a).

III. Fylogeneze exkavát

Fylogeneze exkavát byla po dlouhou dobu poměrně nejistá a často se měnila pozice některých linií. Jedna z nejnovějších fylogenomických studií (Hampl et al., 2009), která se zabývala právě exkaváty, řeší většinu nejasností. Z výsledků studie vyplývá, že exkaváta jsou pravděpodobně rozdělena do tří skupin Discoba, Metamonada a *Malawimonas*.

Skupina Discoba (Hampl et al., 2009) se skládá z jakobidů a discikristát (Heterolobosea, Euglenozoa).

Pojetí skupiny Metamonada se v průběhu let mnohokrát měnilo. Dnes chápeme Metamonada ve smyslu Cavalier-Smith (2003) a Hampl et al. (2005). Metamonada jsou podle těchto studií také monofyletická a rozpadají se na Trichozoa a Preaxostyla. Trichozoa se dále dělí na Parabasalia a Fornicata (Cavalier-Smith, 2003).

Největší problém je s umístěním rodu *Malawimonas*. Molekulární data řadí (po vyřazení taxonů s dlouhými větvemi) tento rod jako sesterskou skupinu metamonád, ale statistická podpora pro tuto variantu je nízká (Hampl et al., 2009). Cavalier-Smith (2003) na základě podobností mezi strukturou bazálních tělísek (BT) u některých exkavátů spekuluje, že předek metamonád se vyvinul z organismu, který byl podobný rodu *Malawimonas*, jak strukturou BT, tak přítomností ploutvičky na zpětném bičíku. Molekulární data tuto variantu dostatečně nepodporují. Na druhou stranu přítomnost diskovitých mitochondriálních krist svědčí o příbuznosti s jakobidy a discikristáty. Pro určení příbuznosti tohoto organismu bude nutný další výzkum.

Nejnověji popsanou linií exkavát je rod *Tsukubamonas* (Yabuki et al., 2011). Ze studie není jasné, do jaké skupiny ho zařadit, ale zřejmě patří do skupiny Discoba a asi tvoří vlastní linii mimo Jakobida i Discicristata.

Dnešní podoba skupiny Excavata (podle Hampl et al. 2009; Yabuki et al., 2011):

1. Discoba
 - 1.1. Jakobida
 - 1.2. Discicristata
 - i. Heterolobosea
 - ii. Euglenozoa
 - 1.3. *Tsukubamonas*
2. Metamonada
 - 2.1. Trichozoa
 - i. Fornicata
 - ii. Parabasalia
 - 2.2. Preaxostyla
 - i. *Trimastix*
 - ii. Oxymonadida
3. *Malawimonas*

IV. Popis cytoskeletu exkavát

Pro podrobný popis mastigontu jsem zvolil organizmus *Anadalucia incarcerata* (Simpson a Patterson, 2001) ze skupiny Jakobida. Je to typický exkavát a v této studii byla její ultrastruktura velice dobře popsána. Další typičtí exkaváti, to jest jakobidi, *Trimastix*, *Carpediemonas*, retortamonády a *Malawimonas* (Simpson, 2003), mají stavbu velmi podobnou, liší se pouze v podrobnostech, které jsou následně u těchto skupin uvedeny (v některých případech jsou tyto odlišnosti uvedeny hned u tohoto prvotního popisu, aby byl dobře znatelný rozdíl). V tomto popisu je rozveden popis typických exkavátních znaků, které určil Simpson (2003). U taxonů, které mají jinou stavbu, popisují typické zástupce dané skupiny.

Cytoskelet typických exkavát se skládá z bazálních tělísek, s nimi asociovaných fibril z nemikrotubulárního materiálu, dále ze dvou hlavních mikrotubulárních kořenů a s nimi asociovaných struktur, které jsou morfologicky spojeny se zpětným bičíkem. S anteriorním bičíkem je spojen jeden mikrotubulární kořen (O'Kelly, 1993; Simpson a Patterson, 2001).

Přední kořen (AR, „anterior root,“ R4)

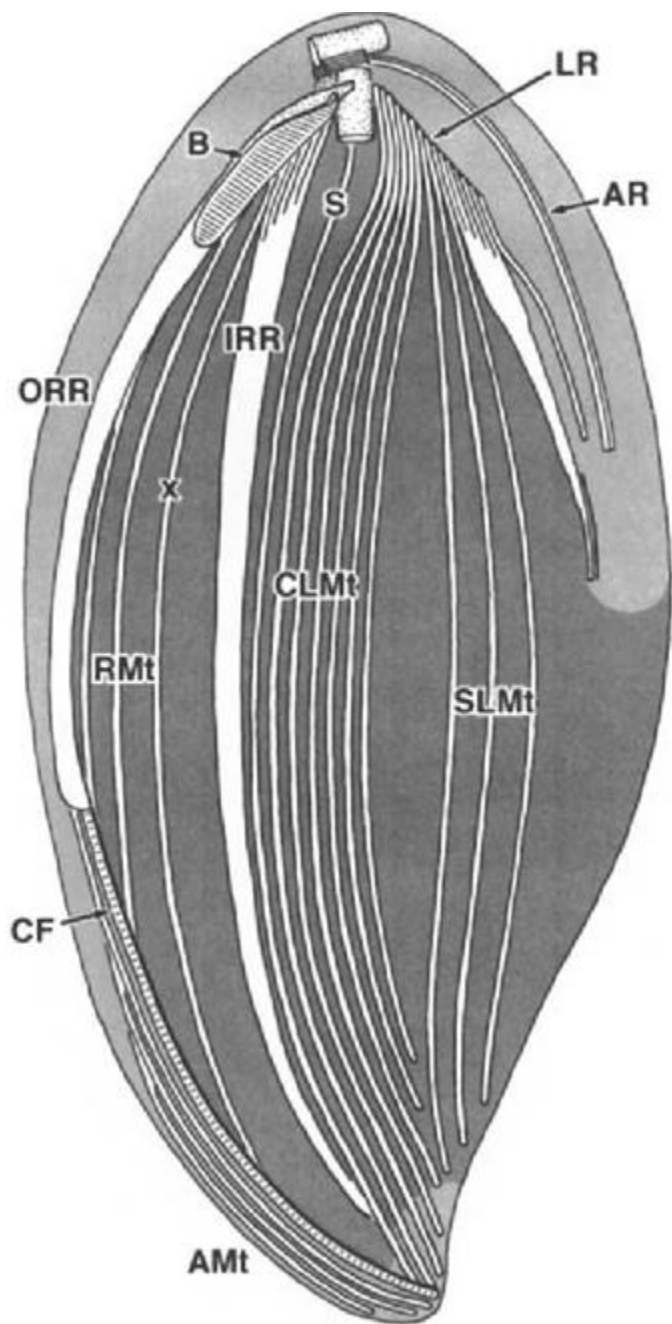
Tento mikrotubulární kořen začíná na vnitřní straně bazálního tělíska anteriorního bičíku. Stáčí se na levou stranu buňky, kde se postupně přibližuje k levému kořenu. Pomáhá podpírat levou stranu břišní rýhy. Většinou se skládá jen z malého počtu mikrotubulů. Tento kořen může být asociován s druhou strukturou, která je spojená s anteriorním bazálním tělískem. Touto strukturou je dorzální vějíř mikrotubulů, které podpírají dorzální a laterální stěny buňky. *Anadalucia incarcerata* (Simpson a Patterson, 2001) nemá tento vějíř nijak viditelně asociován s dorzálním vějířem. Naopak *Carpediemonas membranifera* (Simpson a Patterson, 1999) má vějíř asociovaný s AR.

Struktury, které jsou asociovány s posteriorním bazálním tělískem, jsou četnější. Posteriorní bazální tělísko je asociováno se dvěma hlavními mikrotubulárními kořeny a s jedním menším. Pravý a levý kořen se podílí na vyztužení břišní rýhy. S těmito kořeny jsou spojené další nemikrotubulární struktury (Simpson a Patterson, 2001).

Levý mikrotubulární kořen (R2, „left root“)

R2 začíná na levé straně posteriorního bazálního tělíska a probíhá směrem k zadnímu konci buňky. Je tvořen plochou řadou mikrotubulů, jejichž počet je na počátku kořene malý a postupně se jejich počet zvyšuje. Vnitřní mikrotubuly se od sebe rozestupují a tvoří LMt („left root-originating groove microtubules“). Dále se dělí na dvě větve. Prvních přibližně šest mikrotubulů tvoří pás, který se po otevření břišní rýhy stačí k její ose, brzy se přiblíží k „singlet root“ a pokračují společně s ním podél levé strany vnitřní větve R1. Těchto šest mikrotubulů je označeno jako CLMt („coherent portion of left root-originating groove microtubules“). Druhá větev LMt se nazývá SLMt („sparse portion of left root-originating groove microtubules“). Je tvořena také jen z malého počtu mikrotubulů a tvoří část dna břišní rýhy mezi CMLt a levou stěnou břišní rýhy.

Po ukončení C fibrily tvoří podporu pro levou stěnu břišní rýhy R2 a AR. Vnější stranu podpírá AR a z R2 se odděluje mikrotubulus, který je na vnější straně a je s R2 spojen tenkou fibrilou. Po několika mikrometrech AR i tento osamocený mikrotubulus končí a podpůrnou úlohu přebírají tři mikrotubuly, které se



OBR. 1: Znárodnění průběhu většiny struktur (mikrotubulárních i nemikrotubulárních) u Andaluca incarcerata. AMt = mikrotubuly asociované s CF; CLMt = „coherent portion of left root-originating groove microtubules“; AR = dorsální mikrotubulární kořen; B = B fibrilla; CF = „composite fibre“; IRR = vnitřní větev R1; LR = levý mikrotubulární kořen; ORR = vnější větev R1; S = singlet root; SLMt = sparse portion of left root-originating groove microtubules (Simpson a Patterson, 2001)

oddělují od R2 kousek pod začátkem břišní rýhy. Na mikrotubulu, který je z těchto tří nejvíc distálně umístěn, je destička, která pomáhá podírat levou stěnu břišní rýhy. Vnitřní mikrotubuly postupně zanikají. Dále už břišní rýha nemá žádnou výraznější podporu levé stěny.

C fibrila

Tato nemikrotubulární struktura byla poprvé popsána u organismu *Jakoba libera* (Patterson, 1990). Vychází z levé dorzální strany posteriorního bičíku. Pak běží podél levé strany břišní rýhy směrem k zadnímu konci buňky.

C fibrila je vícevrstevná. Počet vrstev je různý: *Jakoba libera* má čtyři vrstvy (Patterson, 1990), *Andalucia incarcerata* má vrstvy tři (Simpson a Patterson, 2001). Díky této vrstevnatosti byla C fibrila dříve nazývána také MLS („multilayered structure“; O’Kelly, 1997). Na ventrální straně této fibrily se nachází R2 (Patterson, 1990).

Pravý mikrotubulární kořen (R1, „right root“)

Na svém počátku přiléhá R1 k posteriornímu bazálnímu tělísku. U většiny exkavát dochází k rozdělení R1 na vnitřní (IRR) a vnější (ORR) větev. K tomuto rozštěpení může dojít takřka hned po vzniku R1, jako u *Carpediemonas membranifera* (Simpson a Patterson, 1999) nebo až po několika stech nanometrech, jakou *Reclinomonas americana* (O’Kelly, 1997). IRR se skládá přibližně z šesti mikrotubulů, probíhá u základny pravé stěny a pomáhá ji vyztužovat. Ve vnější větvi (ORR) se počet mikrotubulů směrem k zadní části buňky zvyšuje. Mikrotubuly lokalizované zcela mediálně se odštěpují od zbytku a tvoří RMt („right-most of the right root-originating groove microtubules“). Tato větev se nevzdaluje od ostatních mikrotubulů a spolu s nimi podporuje pravou stěnu břišní rýhy (Simpson a Patterson, 2001).

V zadní části, kde se břišní rýha začíná zužovat, mikrotubuly ORR tvoří záhyb tvaru J. Na vnitřní straně tohoto záhybu se objevuje struktura, která se mikrotubulů z ORR nedotýká, ale je s nimi spojena tenkými fibrilami. Směrem k zadní části buňky se tato struktura rozšiřuje v tyčinkovitý útvar. Je to „composite fibre“ (CF). Postupně se CF přesunuje na vnější okraj ORR, který po cca 400 nm existence CF končí. CF pak pokračuje ve spojení s RMt. Z mikrotubulů, které přiléhají k CF, se stávají AMt (mikrotubuly asociované s CF). Postupně se mikrotubuly z RMt sdružují s mikrotubuly AMt. Nejprve končí mikrotubuly z AMt, o kousek dále i mikrotubuly z RMt. CF je žíhaná s periodou asi 30 nm.

Konec břišní rýhy

Ve všech zbývajících větvích se počet mikrotubulů postupně zmenšuje. CF se přibližuje k LMt a žlábek se uzavírá.

Pravý mikrotubulární kořen je podporován nemikrotubulárními strukturami, jedná se o I a B fibrilu.

I fibrila

Je to jedna ze dvou hlavních nemikrotubulárních struktur, které jsou asociovány s R1. I fibrila se nachází na jeho ventrální straně a je přibližně stejně široká jako mikrotubuly pravého kořene. I fibrila se skládá ze dvou paralelních „listů“ amorfního materiálu, který je spojen s R1 pomocí mnoha spojek. Běží podél R1, ale přímo se ho nedotýká. Může s ním být spojena pomocí fibril. Na začátku R1 leží I fibrila u všech mikrotubulů, ale jak se otevírá břišní rýha, tak sleduje pouze ty nejkrajnější mikrotubuly. I fibrila je také jedním z nejrozšířenějších znaků mezi exkaváty. Krom euglenozoi a parabasalií byla popsána homologická struktura u všech linií. (O'Kelly, 1997; Simpson a Patterson, 2001; Simpson et al., 2002; Simpson, 2003; Yabuki et al., 2011).

B fibrila

Poprvé byla tato struktura zaznamenána Pattersonem (1990) u organismu *Jakoba libera*. Tato nemikrotubulární struktura leží na vnitřní straně R1. Pomáhá vyztužovat pravou stranu břišní rýhy. Většinou B fibrila začíná u R1 (Patterson, 1990; Simpson a Patterson, 2001), ale u *Carpodomonas mebranifera* začíná u R2 (Simpson a Patterson, 1999). Její šíře je stejná jako u I fibrily a R1. B fibrila je žíhaná s periodou žíhání cca 30 nm. Tato periodicitu je zachována téměř u všech zkoumaných exkavátů. U retortamonád se tato struktura nazývá „arched fibre“ (Bernard et al., 1997).

„Singlet root“ (SR)

Poslední menší mikrotubulární kořen je obvykle tvořen pouze jediným mikrotubulem. Začíná u posteriorního bazálního tělíska a probíhá směrem k zadní části buňky. Většinu své délky probíhá podél CMLt. Leží pod dnem břišní rýhy a vyztužuje ji.

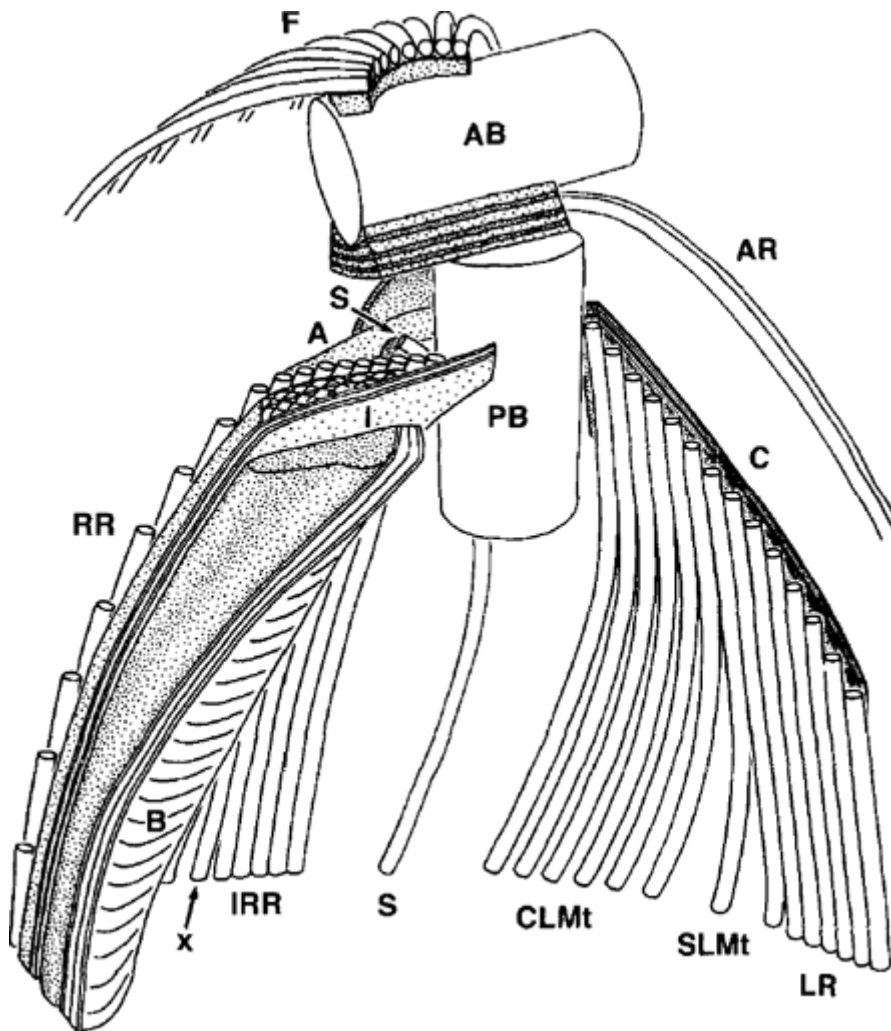
Struktura bičíku

Bazální tělíska jsou na sebe umístěna kolmo, mezera mezi nimi je vyplněna žíhaným materiálem (Simpson a Patterson, 2001).

Přední bičík má strukturu typickou pro eukaryota, tj. $9 \times 2 + 2$. Zadní bičík má také typickou $9 \times 2 + 2$ stavbu mikrotubulů, navíc u mnoha exkavát obsahuje paraxonemální tyč, která vyztužuje ploutvičku. Tato ploutvička se nachází na zpětném bičíku, který leží v břišní rýze. Ploutvička bičíku uděluje mnohem větší záběr, a tak zvyšuje přísun bakterií do břišní rýhy. U různých skupin je počet ploutviček odlišný. Větší počet ploutviček je účinnější než jedna. U jakobidů byla pozorována ploutvička jedna (Patterson, 1990; Flavin a Nerad, 1993;

Simpson a Patterson, 2001). U *Reclinomonas americana* je ploutvička orientována k dorzálnímu okraji pysku. Neprobíhá podél celé délky bičíku (O'Kelly, 1997).

U *Malawimonas* je také jedna ploutvička a je umístěna ventrálně (O'Kelly a Nerad, 1999). *Trimastix pyriformis* má na zpětném bičíku ploutvičky dvě (O'Kelly et al., 1999). *Carpediemonas membranifera* má na zpětném bičíku tři ploutvičky (Simpson a Patterson, 1999).



OBR. 2: Rekonstrukce anteriorního konce buňky u *Andaluca incarcerata*. Pohled z ventrální strany směrem k dorzální. Na této rekonstrukci lze dobře pozorovat stavbu mikrotubulární i nemikrotubulární složky cytoskeletu. A = A fibrila; AB = anteriorní bazální tělísko; AMt = mikrotubuly asociované s CF; AR = dorsální mikrotubulární kořen; B = B fibrila; C = C fibrila; CLMt = „coherent portion of left root-originating groove microtubules“; CF = „composite fibre“; F = dorzální vějíř mikrotubulů; IRR = vnitřní větev R1; LR = levý mikrotubulární kořen; PB = posteriorní bazální tělísko; RR = pravý mikrotubulární kořen; S = „singlet root“; SLMt = „sparse portion of left root-originating groove microtubules“ (Simpson a Patterson, 2001)

V. Diverzita a zánik exkavátních znaků v jednotlivých liniích

5.1. *Malawimonas*

Malawimonas je rod typických exkavátů. Buňky jsou malé, většinou do 10 μm . Mají dva bičíky, které vycházejí z anteriorního konce buňky. Jeden z nich směřuje dopředu a slouží k pohybu, druhý je asociován s břišní rýhou a podílí se na tvorbě proudu vody do břišní rýhy. Tento bičík má na sobě jednu ploutvičku, která se nachází na ventrální straně. Jsou to volně žijící organizmy, nikdy nepřisedají a netvoří si žádné schránky. *Malawimonas* má diskovité mitochondriální kristy. Tvoří jednobuněčné cysty (O'Kelly a Nerad; 1999). Jejich postavení v rámci exkavát je nejasné (Hampl et al., 2009)

5.2. *Discoba*

5.2.1. Jakobida

Jakobida je malá skupina typických exkavátů. Žijí ve vodě a v půdě. Stejně jako rod *Malawimonas* mají malé buňky, většinou do 10 μm . Jsou to volně žijící heterotrofní organizmy. Buňky mají dva bičíky vycházející z přední části buňky. Jeden směřuje dopředu, ten slouží k pohybu. Druhý směřuje dozadu, leží v břišní rýze a svým pohybem nahání potravu do oblasti břišní rýhy, kde je pohlcována. V této skupině se vyskytují organizmy, které mají loriku, jako *Reclinomonas americana* (Flavin a Nerad, 1993), i organizmy bez ní, např. *Andalucia godoyi* (Lara et al., 2006).

Tato skupina je zajímavá hlavně kvůli mitochondriím. *Reclinomonas americana* má nejméně odvozený mitochondriální genom, který je nám znám, obsahuje nejvíc genů ze všech známých mitochondrií (ale ne nejvíce DNA), kóduje 97 genů (Lang et al., 1997). Mitochondrie *R. americana* také kóduje vícepodjednotkovou RNA polymerázu, která je charakteristická pro eubakterie. Zbytek eukaryot má mitochondriální RNA polymerázu kódovanou jaderně. V jádru je však RNA polymeráza kódovaná pouze jedním polypeptidem. Krom toho tato polymeráza není homologická bakteriální polymeráza, ale polymeráze z fágů T3 a T7.

Podrobný popis ultrastruktury jakobidů je v kapitole popisu cytoskeletu a exkavátních znaků.

5.2.2. Heterolobosea

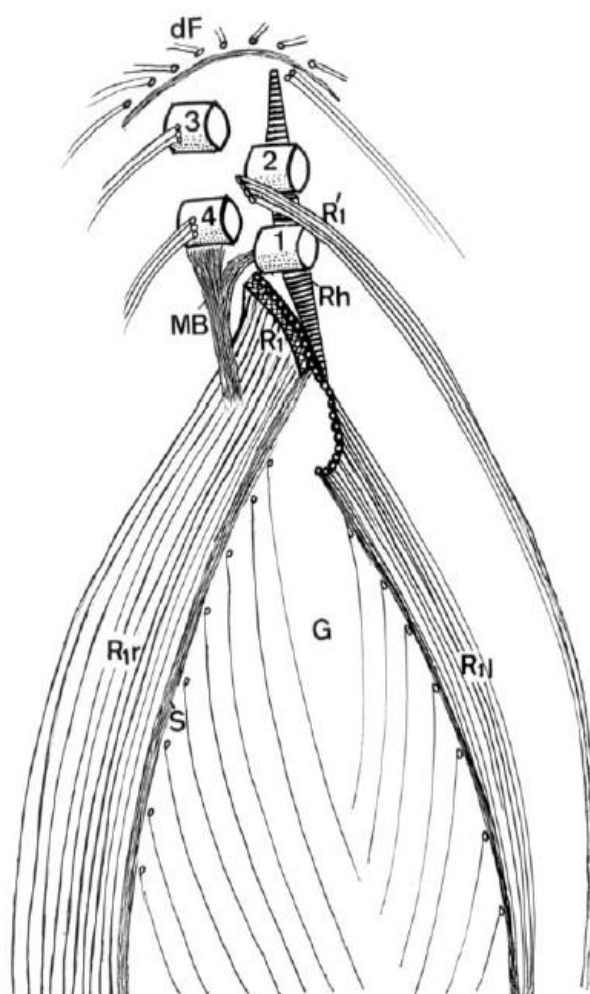
Je to poměrně malá skupina organismů, ustanovená Pagem a Blantonem (1985). Do heteroloboseí řadíme organizmy, které mají amébové i bičíkaté stádium (*Naegleria*). Zahrnuje ale i organizmy jak pouze s bičíkatým (např. *Percolomonas*), tak pouze s amébovým stádiem (např. *Vahlkampfia*) (Wilhelm a Anderson, 1971). V této skupině dokonce vznikla mnohobuněčnost, např. rody *Acrasis*, *Pocheina* (Olive et al. 1983; Brown et al., 2010).

Převážná většina heteroloboseí je volně žijící, ale několik zástupců může přežít i v lidském těle a vyvolat smrtelná onemocnění. Takovýmto organismem je např. *Naegleria fowleri*, která může způsobit primární amébovou meningo-encefalitidu (Visvesvara et al., 2007).

Stavba cytoskeletu:

Většina bičíkatých stádií heteroloboseí má čtyři BT, např. *Percolomonas descissus* (Brugerolle a Simpson, 2004). Existují i druhy pouze s dvěma BT, např.: *Pleurostomum flabellatum* (Park et al., 2007). Extrémním případem je rod *Stephanopogon*, který má počet bičíků zmnožen až na několik desítek. *Stephanopogon* byl dlouhá léta řazen mezi nálevníky, které svým vzhledem připomíná (viz. Yubuki a Leander, 2008). BT jsou k sobě vázány mikrotubulárními spojkami.

BT 1 je asociováno s mikrotubulárním kořenem (R1). S největší pravděpodobností se dá tento mikrotubulární kořen homologizovat s R1 typických exkavát



OBR. 3: Rekonstrukce mastigontu *Percolomonas descissus* (Brugerolle a Simpson, 2004).
dF = dorzální vějíř mikrotubulů; G = břišní rýha; Rh = rhizoplast; R1r a R1l = pravá a levá větev R1; R1' = dorzální mikrotubulární kořen

U zkoumaných organismů se tento kořen rozpadá na dvě větve (R_{1r} , R_{1l}). U typických exkavát tyto dvě větve podporují pravou a spodní část břišní rýhy.

U heteroloboseí ale úplně chybí struktura R_2 a podpůrnou funkci levé strany břišní rýhy přebírá levá větev R_1 . Pravá větev R_1 si zachovává svoji funkci a podporuje pravou stěnu břišní rýhy a její bázi. R_1 je podepírán I fibrilou, která je homologická s I fibrilou typických exkavátů. Spolu s R_1 se na podpoře břišní rýhy podílí R_1' . Je to mikrotubulární kořen, který vychází od BT 2. Můžeme se však setkat se situací, kdy je břišní rýha podporovaná mikrotubuly, které začínají jinde než u R_1 , např. *Pleurostomum flabellatum* (Park et al., 2007).

Jako u většiny exkavát i zde je systém mikrotubulů, které podporují dorzální a laterální strany buněk. Další strukturou je tlustý svazek mikrofilament označovaný jako MB, který připojuje BT k R_1 .

Heterolobosea mají unikátní strukturu nazývanou rhizoplast (Brugerolle a Simpson, 2004). Rhizoplast je žíhaná fibrila s periodou žíhání cca 35 nm (v některých částech však pouze 18 nm). Přiléhá z vnější strany k levým bazálním tělískům. Vyskytují se její mnohé modifikace, může se dělit na několik větví *Tetramitus rostratus* (Outka a Kluss, 1967), u rodu *Naegleria gruberi* (Brugerolle a Simpson, 2004) rhizoplast prochází od anteriorního konce buňky hluboko do buňky a probíhá okolo jádra. Brugolle a Simpson (2004) zvažují možnost, že tato struktura je homologem A fibrily, která je přítomná v některých exkavátních exkavátech.

Brugerolle a Simpson (2004) rozpoznávají tedy alespoň u některých skupin tři z osmi typických exkavátních znaků – břišní rýha, I fibrila, rozdělený pravý mikrotubulární kořen.

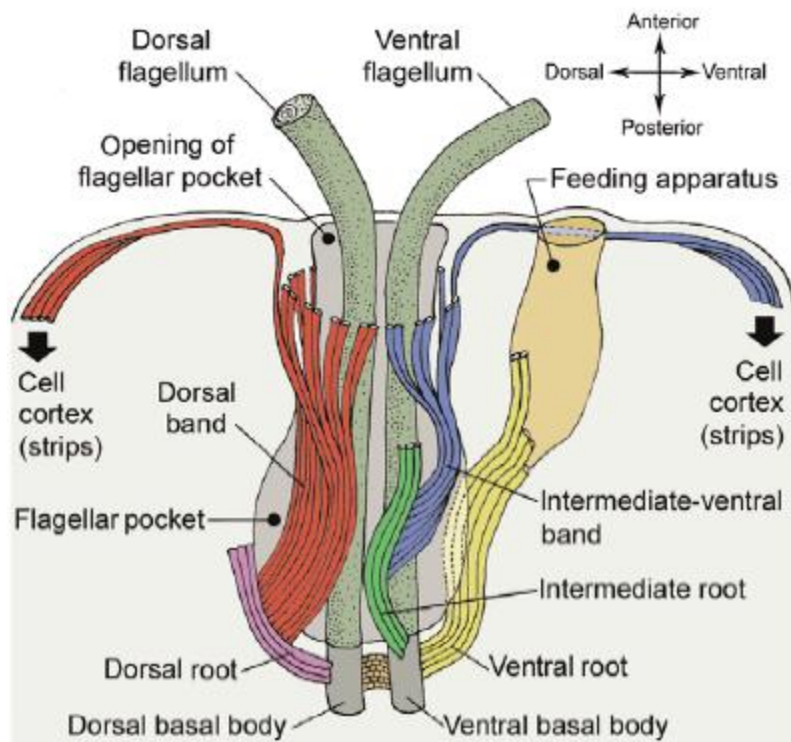
5.2.3. Euglenozoa

Tato skupina je velmi významná a v budoucnosti bude poměrně intenzivně studována, protože je možné, že mezi touto skupinou a zbytkem eukaryot leží kořen všech eukaryot (Cavalier-Smith, 2010). Jejich ultrastruktura postrádá exkavátní znaky a o podobnosti některých znaků s exkaváty se můžeme jen dohadovat. Na druhou stranu příbuznost s heteroloboseí je díky molekulárním studiím velice dobře podpořena (Silberman et al., 2002; Hampl et al., 2009). V zásadě lze Euglenozoa rozdělit na čtyři skupiny a to Kinetoplastea, Euglenoidea, Symbiontida, Diplonemea (Simpson a Roger, 2004 b; Adl et al., 2005; Yubuki et al., 2009).

U euglenidů můžeme najít mnoho způsobů výživy bakteriovorii, eukaryovorii, osmotrofii i fototrofii.

Většina zástupců euglenozoi má dvě BT, která jsou asociována se třemi mikrotubulárními kořeny. BT jsou orientována paralelně na anteriorním konci buňky. Z těchto BT vycházejí dva bičíky, jeden přední a druhý zadní, u mnohých dochází k výraznému zkrácení jednoho z bičíků. Oba jsou podpořeny paraxonemální tyčí. Každý bičík má však odlišnou strukturu této paraxonemální tyče. U anteriorního bičíku má tubulární strukturu, u zpětného žíhanou (Cachon et al., 1988).

BT předního bičíku je asociován s jedním mikrotubulárním kořenem, což je dle Moestrupa (2000) R4. To je alternativní pojmenování pro AR. Vychází od BT a většinou není moc dlouhý. Podle mnoha studií tento mikrotubulární kořen může působit jako organizační centrum, ze kterého vzniká dorzální pás mikrotubulů. Tyto mikrotubuly podporují flagelární kapsu a odštěpují se z nich další mikrotubuly, které podporují buněčný kortex. Pozičně i strukturou by se tyto komponenty cytoskeletu daly teoreticky homologizovat s AR u typických exkavát a s dorzálním vějířem mikrotubulů, které jsou s ním asociovány. Ve skupině Euglenozoa není velká diverzita v této struktuře.



Obr. 4: Obecná morfologie mastigontu euglenozoi (Leander, 2004)

Ventrální mikrotubulární kořen je asociován s BT 1, Simpson (2003) se domnívá, že by tento kořen mohl být homolog R1 u typických exkavát. Euglenozoa nemají břišní rýhu, ale mají aparát, kterým přijímají potravu. Tento aparát je podporován ventrálním mikrotubulárním kořenem. Obvykle jde o kanál, na jehož dně dochází k pohlcování potravy a často se nachází v blízkosti flagelární kapsy.

Druhým mikrotubulárním kořenem, který je asociovaný s BT 1, je R2. Tento mikrotubulární kořen je asociovaný s flagelární kapsou a mohou u něj začínat mikrotubuly,

kteří podporují povrchové struktury. (Willey a Wibel, 1985; Owens et al., 1988; Simpson, 1997).

5.2.4. *Tsukubamonas globosa*

Tento zástupce skupiny Excavata byl popsán teprve v letošním roce (Yabuki et al., 2011). Zástupci tohoto druhu mají kulaté buňky, které se při pohybu vodním sloupcem točí, nikdy nepřisedají k podkladu a mohou zřejmě tvořit cysty. Tento organizmus je zajímavý tím, že autoři ve většině případů nepozorovali u buněk břišní rýhu. V menší míře však byly zaznamenány buňky, které si vytvořily dočasnou mělkou břišní rýhu během pohlcování bakterií.

Buňky mají čtyři BT, ale pouze ze dvou vybíhají bičíky. BT bez bičků lze najít i u dalších zástupců exkavát, např. *Carpediemonas membranifera*, *Hicanonectes teleskopos* (Simpson a Patterson, 1999; Park et al., 2009). U exkavát, která mají BT, ze kterého nevyhází bičík, je toto BT asociováno s BT, které bičík nese, např. *Carpediemonas membranifera* (Simpson a Patterson, 1999). U *T. globosa* jsou BT rozdělena na dva páry. Jeden pár bičků nese a druhý ne, tím je *T. globosa* unikátní mezi zástupci exkavát.

Stejně jako u heteroloboseí chybí u *T. globosa* R2 a na podpoře levé strany břišní rýhy se tak podílí R1 a SR. Ztráty R2 u *T. globosa* a heteroloboseí však mohou být na sobě nezávislé.

T. globosa postrádá dorzální vějíř mikrotubulů, a tak musí být dorzální strana podpírána jiným způsobem. Mikrotubuly, které se nazývají Imt („internal microtubules“), plní tuto roli. Těmto mikrotubulům ještě pomáhají další, které jsou odvozeny od centrální části R1 a nazývají se BRR. I a B fibrila jsou stejné jako u exkavátních exkavát EE.

Se SR je asociována SA („single-root associated fiber“), která byla zaznamenána např. u rodu *Dysnectes* (Yubuki, et. al., 2007). V *T. globosa* je tato struktura oproti rodu *Dysnectes* poměrně velká a má páskovaný vzhled.

Pouze na základě morfologických dat není možné rozhodnout, kam druh *T. globosa* zařadit. Některé znaky poukazují na příbuznost s heteroloboseí a jakobidy, ale když se znaky posuzují jako celek, tak nezapadají ani do jedné ze skupin. Fylogenetická analýza prokázala, že *T. globosa* patří do skupiny Discoba, ale autorům se ji nepodařilo umístit do žádné z definovaných skupin (Euglenozoa, Heterolobosea, Jakobida), a tak vytvořili ve skupině Discoba nové oddělení právě pro *Tsukumonas globosa* (Yabuki et al., 2011).

5.3. Metamonada

Metamonada je poměrně velká skupina organismů. V původním stavu měly metamonády zřejmě čtyři bičíky (Cavalier-Smith, 2003). V různých skupinách dochází k redukci či zmnožení bičíků. Někteří mají typicky exkavátní cytoskelet, např. *Trimastix* (O'Kelly et al., 1999), *Carpediemonas membranifera* (Simpson a Patterson, 1999), *Ergobibamus cyprinoides* (Park et al., 2010) a další. U některých dochází k částečné redukci exkavátních znaků, jako u skupiny Diplomonadida. K úplné ztrátě exkavátních znaků dochází u skupiny Parabasalia.

Metamonády jsou bez výjimky anaerobní a některé linie byly často považovány za Archezoa (Cavalier-Smith, 1983). U většiny z nich byly objeveny organely, které jsou odvozené od mitochondrie, to jsou buď hydrogenosomy, nebo mitosomy. Některé metamonády dále nemají Golgiho aparát, naopak Parabasalia jej mají velice dobře vyvinut. Většina z nich jsou endobionti. Jejich vztah k hostiteli se pohybuje od mutualizmu až k parazitizmu. Několik rodů žije i volně, jako např. *Trimastix*, *Carpediemonas* apod.

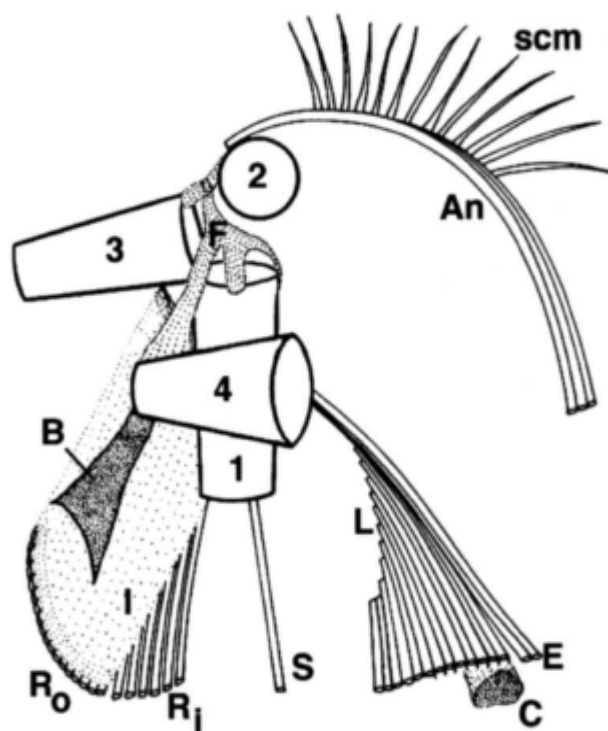
Patří sem Fornicata (diplomonády, retortamonády a karpediemonády), Preaxostyla (oxymonády a *Trimastix*) a Parabasalia.

5.3.1. Preaxostyla

Oxymonády jsou skupinou, která většinou žije ve střevech termitů a jiných bezobratlých. Proto došlo k poměrně výrazné ztrátě exkavátních znaků. Naopak rod *Trimastix* je volně žijící.

Rod *Trimastix* obývá prostředí s nízkým obsahem kyslíku, kde se živí bakteriemi. Nebyla u něj zjištěna přítomnost pravé mitochondrie, ale byly u něj nalezeny organely, které mají dvojitou membránu a jsou asi odvozeny od mitochondrie (O'Kelly et al., 1999). Morfologicky je to typický exkavát. Má čtyři BT, která nesou bičíky, tři jsou přední a jeden je zpětný a leží v břišní rýze. BT 1 a 4 tvoří kříž a BT 2 a 3 jsou u sebe umístěna v podobě písmene L (viz obr 5.). BT 1 a 2 jsou asociována s dalšími strukturami. Od BT 2 vychází svazek mikrotubulů, který je homologický s AR a podpírá levou stranu buňky. S AR jsou asociovány další mikrotubuly.

BT 1 nese zpětný bičík a jako u ostatních EE jsou s ním asociované tři mikrotubulární kořeny. R2 podpírá levou stranu břišní rýhy a je podporován C fibrilou. R1 podporuje pravou stranu břišní rýhy, rozpadá se na dvě větve. Ventrální strana R1 je vyztužena B a I fibrilou, zatímco z dorzální strany je podporována A fibrilou, která je přítomná pouze u některých exkavátů. Posledním mikrotubulárním kořenem je SR, který zpevňuje dno břišní rýhy.



OBR. 5: Rekonstrukce mastigontu rodu *Trimastix* (O'Kelly et al., 1999)

An = dorzální mikrotubulární kořen; B = B fibrila, C = C fibrila; E + L = větve levého mikrotubulárního kořene; F = spojky bazálních tělísek R₀ a R₁ = větve pravého mikrotubulárního kořene; S = „singlet root“

Monocercomoides byla podrobně zkoumána ve studii Simpson et al. (2002), kdy autoři srovnávali znaky oxymonád a jiných exkavát.

Bazální tělísko 4 (odpovídá BT rodu *Trimastix*)

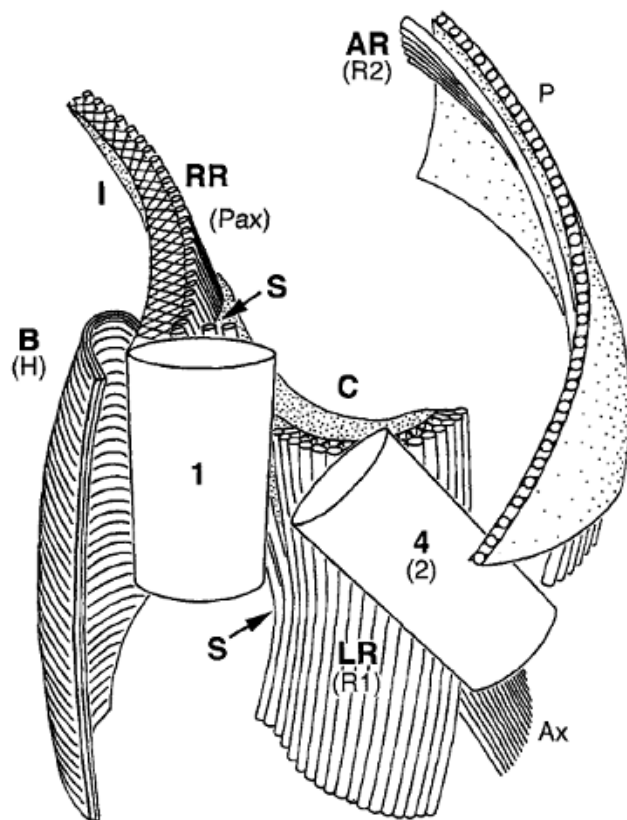
Toto bazální tělísko je spojeno s mikrotubulárním kořenem (R2), který je homologický s AR u EE. S AR je také asociována pelta, jejíž mikrotubuly se dají homologizovat s mikrotubuly vyztužujícíím dorzální stranu EE. Bazální tělísko 1 (odpovídá BT 1 u *Trimastix*). Od tohoto BT se rozbíhá jeden mikrotubulární kořen, který začíná na levé straně BT a dá se přiřadit k R2 EE, stejně jako u EE. Na jeho dorzální straně se nachází fibrila, která se svým složením dá homologizovat s C fibre u EE. R1 byl rozpoznán jako mikrotubulární složka preaxostylu (Pax). Preaxostyl je charakteristická struktura oxymonád, která pomáhá vyztužovat jejich buňku. Druhou složkou preaxostylu je jeho parakrystalinní část. Ta má podobné umístění jako I fibrila u EE, obě přiléhají k ventrální straně R1, jsou žíhané. Parakrystalinní složka zřejmě odpovídá I fibre u EE.

H fibrila, která je homolog B fibrily u EE, začíná na vnitřní straně R1 (Pax). Tato fibrila má strukturu několika plátů na sobě a je stejně jako B fibrila žíhaná s periodou cca 30 nm.

Posledním mikrotubulárním kořenem, který lze nalézt i u EE, je „singlet root“. U většiny typických exkavát je SR tvořen pouze jediným mikrotubulem, ale u *Monocercomonoides* je tvořen dvěma mikrotubuly. Opět se dají homologizovat podle pozice vůči bazálním tělískům, začínají mezi posteriorním BT a R1 (Pax).

U *Monocercomoides* nenalezneme břišní rýhu, která definuje exkaváta (Simpson a Patterson, 1999). Začátek zpětného bičíku je ukryt v krátkém tunýlku, jehož pravá strana je podporována R1, B (H) fibrilou. Dva mikrotubuly (homologické k „singlet root“)

vyztužují část levé strany tohoto kanálku. To svědčí pro možnou příbuznost těchto struktur. Za touto přeměnou stojí pravděpodobně změna dostupnosti potravy v závislosti na přechodu od volného způsobu života k endosymbiotickému. R1 už nemusel vyztužovat břišní rýhu a došlo k jeho transformaci na vnitřní výztuhu buňky.



OBR. 6: Rekonstrukce mastigontu u *Monocercomoides*. Zobrazeny jsou pouze BT nesoucí určité struktury.

AR = dorzální mikrotubulární kořen, Ax = axostyl; B = B fibrila; C = C fibrila; I = I fibrila; LR = levý mikrotubulární kořen; P = pelta; RR = pravý mikrotubulární kořen; S = singlet root (Simpson et al., 2002)

5.3.2. Parabasalia

Tyto organizmy nemají žádný z exkavátních znaků (Simpson, 2003). I tak je jejich mastigont poměrně zajímavý. Morfologicky jsou Parabasalia rozdělena na dvě skupiny na „malé trichomonády“ a „brvitky“, avšak ani jedna z těchto skupin není monofyletická (Cepicka et al., 2010).

„Malé trichomonády“ mají většinou 3 – 5 BT, např. *Tritrichomonas foetus* (Honigberg et al. 1971). Ze všech, krom jednoho, vycházejí přední bičíky a z posledního BT vychází zpětný bičík. Simpson (2003) se domnívá, že díky orientaci bičíku lze zpětný bičík přiřadit k bičíku 1 EE a bičík číslo 2 k bičíku číslo 2 EE. BT zpětného bičíku je většinou orientováno kolmo na zbylé tři BT.

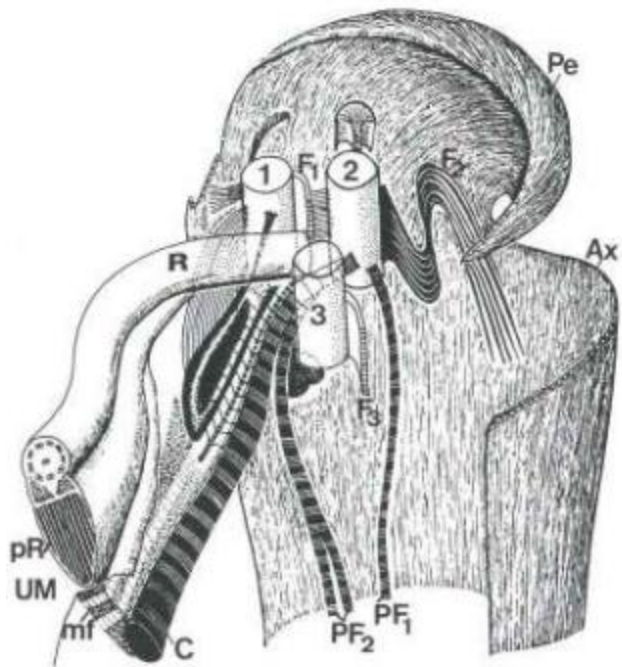
Parabasalia mají systém několika mikrotubulárních i nemikrotubulárních struktur spojených s bazálními tělisky. Nejvýznamnější jsou tyto: axostyl, pelta, parabazální fibrily a kosta.

Parabasální fibrily jsou žíhané, vybíhají z blízkosti BT, u většiny zkoumaných trichomonád od BT 2 (Honigberg et al., 1971; Boykin et al., 1986; Cepicka et al., 2010). Tyto fibrily udržují mohutně vyvinutý Golgiho komplex ve stálé pozici vůči jádru a spolu s ním tvoří parabazální aparát. Na Golgiho komplex se může vázat jedna nebo obě parabazální fibrily.

Pelto-axostylární komplex je tvořen mikrotubuly a jeho struktura je poměrně konzervovaná mezi zkoumanými trichomonádami. Řada

mikrotubulů kryje jádro (kapitulum), pod jádrem směrem k zadní části buňky se mikrotubuly stáčí a vytváří „kmen“, který prochází celou buňkou a končí v trnovitém výběžku. Od kapitula směrem k přední části buňky se další pás mikrotubulů stáčí a vytváří peltu. Ta chrání bazální těliska a jádro buňky (Mattern et al., 1967; Honigberg, 1971; Mattern et al., 1972).

Kosta je opět žíhaná fibrila. Existují dva typy kasty. Typ A, kterou mají skupiny *Tritrichomanadidae* a *Hypotrichomonadidae* (Honigberg et al., 1971; Cepicka et al. 2010), mají shodné žíhání jako parabazální fibrily. Typ B, známý u čeledi *Trichomonadidae* (Honigberg et al., 1971; Cepicka et al. 2010), má žíhání odlišné. I přes svůj odlišný vzhled jsou tyto struktury tvořené z podobných proteinů a jsou to pravděpodobně homologické struktury (Brugerolle a Viscogliosi, 1994).



OBR. 7

Rekonstrukce mastigontu *Tritrichomonas muris*. Ax = axostyl, C = kosta, PE = pelta; PF_{1,2} = parabazální fibrily, UM = undulující membrána (Brugerolle, 1991).

„Brvitky“ mají v zásadě stejnou stavbu mastigontu jako „malé trichomonády,“ ale BT v anteriorní části buňky jsou zmnožena. Často zde existují čtyři prominentní BT, která jsou homologická BT „malých trichomonád“. Počet BT může vzrůst až na několik tisíc, např. u *Deltotrichonympha operculata* (Tamm, 1972; Brugerolle, 1991).

5.3.3. Fornicata

Do skupiny Fornicata řadíme karpediomonády, retortamonády a diplomonády. Retortamonády a karpediomonády mají stavbu typických exkavát, jejich popis se prakticky shoduje s popisem *A. incarcerata*. Ani jedna z těchto skupin ovšem není monofyletická (Cepicka et al., 2008; Kolisko et al. 2010).

Diplomonadida

Většina druhů má čtyři bičíky. Většinou jsou tři přední a jeden zpětný, např. u rodu *Enteromonas* (Brugerolle, 1975). Mnoho zástupců má však buňky zdvojené. Buňky mají dvě jádra a dva mastigonty, např. u *Spironucleus muris* (Brugerolle et al., 1980).

Každý z jedné dvojice mastigontů je tvořen dvěma páry BT. Ze tří vycházejí přední bičíky a jedno BT nese zpětný bičík (většinou označovaný jako „R“). K BT přiléhají tři mikrotubulární kořeny. Zatím u diplomonád nebyly pozorovány ploutvičky na žádném z bičíků (Simpson, 2003).

Od BT 1 vychází „supra-nuclear fibre“ (SNF), což je svazek mikrotubulů. Probíhají směrem k přední části buňky a na vrcholu buňky se překřičují s mikrotubuly, které vycházejí od druhého BT z druhého mastigontu. Na jejich ventrální straně se nachází jádro, které je jimi kryto. Tato struktura by se dle mého názoru možná dala homologizovat s AR nebo s dorsálním vějířem u EE. Usuzuji tak na základě podobné pozice a funkce. K rozsouzení této otázky by byla potřeba další data.

Další mikrotubulární pruhy kryjí jádro i ze spodní strany. Stejně jako SNF se „infra-nuclear fibres“ (INF) překřičují uprostřed buňky a pokračují směrem k zadní části buňky. Při svém průběhu podporují tunel, např. u *Trepomonas agilis* (Eyden a Vickerman, 1975), kterým probíhá zpětný bičík, ale tento tunel není přítomný u všech, např. u *Giardia intestinalis* chybí a zpětné bičíky procházejí jako axonemy přímo cytoplasmou (Cheissin, 1965).

Třetí pruh mikrotubulů vychází od BT zpětného bičíku a podporuje tento tunel (Eyden a Vickerman, 1975), který je také podpořen žíhanou fibrilou. Ta vychází od BT zpětného bičíku (Eyden a Vickerman, 1975; Brugerolle, 1980; Brugerolle, 1991; Dessler, 1993; Sterud, 1998)

U rodu *Giardia* se vyskytuje mikrotubulární struktura, která vychází od BT 1 a tvoří přísavný disk, který kryje anteriorní část buňky, hlavně bazální tělíska. Okraj tohoto disku je vyztužen žíhanou fibrilou. Podle některých autorů (Brugerolle, 1975) lze tuto strukturu homologizovat se SNF.

VI. Závěr

Po shrnutí základních typů mastigontů ve skupině Excavata a způsobu života můžeme naznačit, jaký typ mastigontu je výhodný pro určité prostředí. Volně žijící organizmy, které se živí bakteriemi, si až na pár výjimek podržely břišní rýhu. Tento způsob obživy se jeví být velmi efektivní v prostředí, kde je poměrně málo potravy. Břišní rýha je v tomto případě asociovaná s mnoha strukturami, které vyztužují její stěny a celou buňku. U zástupců, kteří zvolili endosymbiotický způsob života, dochází ve většině případů ke ztrátě nebo modifikaci břišní rýhy a struktur ji podporujících. Těmto organismům se díky bohatému prostředí, ve kterém žijí, vyplatí přijímat potravu celým povrchem těla. Takto je možno za stejný čas pohltnout více potravy, než kdyby používaly břišní rýhu. Potravou mohou být bakterie nebo mohou být živiny přijímány pomocí pinocytózy jako *Giardia intestinalis* nebo *Tritrichomonas foetus*.

V dnešní době se mnoho biologů zaměřuje pouze na molekulární studie a morfologických znaků si tolik nevšímají. Mnohé příbuzenské vztahy byly vyřešeny pomocí studia ultrastruktury. Na druhou stranu bez molekulárních dat by nebylo možné rozřešení některých ne zcela jasných příbuzenských vztahů.

Studium skupiny Excavata má v budoucnu velký potenciál, a to z mnoha důvodů. Cavalier-Smith (2010) se domnívá, že by v této skupině mohl ležet kořen eukaryot. Studium skupiny Jakobida je významné i pro osvětlení mitochondriální endosymbiozy, a i z hlediska sekundárního vzniku anaerobního způsobu života. Z medicínského hlediska bude důležité zkoumat tuto skupinu, protože se zde nachází mnoho lidských patogenů.

Seznam zkratk:

AR – anterior root = mikrotubulární kořen asociovaný s bazálním tělískem 2

BT – bazální tělísko

CLMt – „coherent portion of left root-originating groove microtubules“

EE – exkavátní exkaváti
INF – „infra-nuclear fibre“
LMt – „left root originating groove microtubules“
R1 – „right root“ = pravý mikrotubulární kořen
R2 – „left root“ = levý mikrotubulární kořen
SLMt – „sparse portion of left root-originating groove microtubules“
SNF – supra-nuclear fibre

VII. Použitá literatura:

Sekundární citace jsou označeny*

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup Ø, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MFJR. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2005;52(5):399-451.

Bernard C, Simpson AGB, Patterson DJ. An ultrastructural study of a free-living retortamonad, *Chilomastix cuspidata* (Larsen & Patterson, 1990) n. comb. (Retortamonadida, Protista). *European Journal of Protistology* 1997; 33(3): 254-265.

Boykin MS, Stockert L, Buhse HE, Smithsomerville HE. *Trichomitus-trypanoides* (Trichomonadida) from the Termite *Reticulitermes flavipes* .II. fine structure and identification of the cloned flagellate. *Transactions of the American Microscopical Society* 1986; 105(3): 223-238.

Brown MW, Silberman JD, Spiegel FW. A morphologically simple species of Acrasis (Heterolobosea, Excavata), *Acrasis helenhemmesae* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2010; 57(4): 346-353.

Brugerolle G. Ultrastructural study of *Enteromonas* da Fonseca (Zoomastigophorea) and review of order Diplomonadida Wenyon. *Journal of Protozoology* 1975; 22(4):

468-475.

Brugerolle G. Flagellar and cytoskeletal systems in amitochondrial flagellates – Archamoeba, Metamonada and Parabasala. *Protoplasma* 1991; 164(1-3): 70-90.

Brugerolle G, Kunstyr I, Senaud J, Friedhoff KT. Fine structure of trophozoites and cysts of the pathogenic Diplomonad *Spironucleus muris*. *Zeitschrift Für Parasitenkunde-Parasitology Research* 1980; 62(1): 47-61.

Brugerolle G, Simpson AGB. The flagellar apparatus of heteroloboseans. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2004;51(1): 96-107.

Brugerolle G, Viscogliosi E. Organization and composition of the striated roots supporting the Golgi-apparatus, the so called parabasal apparatus, in parabasalid flagellates. *Biology of the Cell* 1994; 81(3): 277-285.

Bui ETN, Bradley PJ, Johnson PJ. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93(18): 9651-9656.

Cachon J, Cachon M, Cosson MP, Cosson J. The paraflagellar rod – a structure in search of a function. *Biology of the Cell* 1988; 63(2): 169-181.

*Cavalier-Smith T. A 6-kingdom classification and unified phylogeny. In W. Schwemmler and H.E.A. Schenk (ed.), *Endocytobiology II*. De Gruyter, 1027-1034

Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 1998; 73(3): 203-266.

Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2002; 52: 297-354.

Cavalier-Smith T. The excavate protozoan phyla Metamonada Grasse emend.

(Anaeromonadea, Parabasalia, *Carpediemonas*, Eopharyngia) and Loukoozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their evolutionary affinities and new higher taxa. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2003; 53: 1741-1758.

Cavalier-Smith T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. Biology Letters 2010; 6(3): 342-345.

Cepicka I, Hampl V, Kulda J. Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. Protist 2010; 161(3): 400-433.

Cepicka I, Kostka M, Uzlikova M, Kulda J, Flegr J. Non-monophyly of Retortamonadida and high genetic diversity of the genus *Chilomastix* suggested by analysis of SSU rDNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 2008; 48(2): 770-775.

Cheissin EM. Ultrastructure of *Lambliia duodenalis* 2. the locomotory apparatus, axial rod and other organelles. Archiv für Protistenkunde 1965; 108: 8-18.

Dacks JB, Silberman JD, Simpson AGB, Moriya S, Kudo T, Ohkuma M, Redfield RJ. Oxymonads are closely related to the excavate taxon *Trimastix*. Molecular Biology and Evolution 2001; 18(6): 1034-1044.

Desser SS, Hong H, Siddall ME, Barta JR. An ultrastructural study of *Brugerolleia algonquinensis* gen-nov sp-nov (Diplomonadina, Diplomonadida), a flagellate parasite in the blood of frogs from Ontario. European Journal of Protistology 1993; 29(1): 72-80.

Embley TM, Hirt RP. Early branching eukaryotes? Current Opinion in Genetics & Development 1998; 8(6): 624-629.

Eyden BP, Vickerman K. Ultrastructure and vacuolar movements in free-living diplomonad *Trepomonas agilis*. Journal of Protozoology 1975; 22(1): 54-66.

Flavin M, Nerad TA. *Reclinomonas americana* n. g., n. sp., a new freshwater

heterotrophic flagellate. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1993; 40(2): 172-179.

Hampl V, Horner DS, Dyal P, Kulda J, Flegr J, Foster PG, Embley TM. Inference of the phylogenetic position of oxymonads based on nine genes: Support for Metamonada and Excavata. *Molecular Biology and Evolution* 2005; 22(12): 2508-2518.

Hampl V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AGB, Roger AJ. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106(10): 3859-3864.

Hinkle G, Leipe DD, Nerad TA, Sogin ML. The unusually long small subunit ribosomal RNA of *Phreatamoeba*. *Nucleic Acids Research* 1994; 22(3): 465-469.

Hirt RP, Logsdon JM, Healy B, Dorey MW, Doolittle WF, Embley TM. 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* 1999; 96(2): 580-585.

Honigber.Bm, Mattern CFT, Daniel WA. Fine structure of the mastigont system in *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller). *Journal of Protozoology* 1971; 18(2): 183-198.

Kolisko M, Silberman JD, Cepicka I, Yubuki N, Takishita K, Yabuki A, Leander BS, Inouye I, Inagaki Y, Roger AJ and others. A wide diversity of previously undetected free-living relatives of diplomonads isolated from marine/saline habitats. *Environmental Microbiology* 2010; 12(10): 2700-2710.

Lang BF, Burger G, Okelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray MW. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 1997; 387(6632): 493-497.

Lara E, Chatzinotas A, Simpson AGB. Andalucia (n. Gen.) - the deepest branch within jakobids (Jakobida; Excavata), based on morphological and molecular study of a new

flagellate from soil. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2006; 53(2): 112-120.

Leander BS. Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends in Microbiology* 2004; 12(6): 251-258.

Mattern CFT, Daniel WA, Honigber.Bm. Structure of *Monocercomonas* sp. as revealed by electron microscopy. *Journal of Protozoology* 1972; 19(2): 265-274.

Mattern CFT, Honigber.Bm, Daniel WA. The mastigont system of *Trichomonas gallinae* (Rivolta) as revealed by electron microscopy. *Journal of Protozoology* 1967; 14(2): 320-339.

Moestrup, Ø. (2000). The flagellate cytoskeleton: introduction of a general terminology for microtubular flagellar roots in protists. In *The Flagellates: Unity, Diversity and Evolution*. Edited by J. C. Greenand B. S. C. Leadbeater. London: Taylor & Francis.

Myl'nikova ZM, Myl'nikov AP. Biology and morphology of freshwater rapacious flagellate *Colponema aff. loxodes* Stein (*Colponema*, Alveolata). *Inland Water Biology* 2010; 3(1): 21-26.

O'Kelly CJ. Ultrastructure of trophozoites, zoospores and cysts of *Reclinomonas americana* Flavin & Nerad, 1993 (*Protista incertae sedis*: Histonidae). *European Journal of Protistology* 1997; 33(4): 337-348.

O'Kelly CJ, Farmer MA, Nerad TA. Ultrastructure of *Trimastix pyriformis* (Klebs) Bernard et al.: similarities of *Trimastix* species with retortamonad and jakobid flagellates. *Protist* 1999; 150(2): 149-162.

O'Kelly CJ, Nerad TA. *Malawimonas jakobiformis* n. gen., n. sp (Malawimonadidae n. fam.): A Jakoba-like heterotrophic nanoflagellate with discoidal mitochondrial cristae. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1999; 46(5): 522-531.

O'Kelly CJ. The Jakobid flagellates: structural features of *Jakoba*, *Reclinomonas* and

Histiona and implications for the early diversification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1993; 40(5): 627-636.

Olive LS, Stoianovitch C, Bennett WE. Description of Acrasid cellular slime molds *Pocheina rosea* and a new Species, *Pocheina*. *Mycologia* 1983; 75(6): 1019-1029.

Outka DE, Kluss BC. Ameba to flagellate transformation in *Tetramitus rostratus* .2. microtubular morphogenesis. *Journal of Cell Biology* 1967; 35(2): 323-346.

Owens KJ, Farmer MA, Triemer RE. The flagellar apparatus and reservoir canal cytoskeleton of *Cryptoglana pigra* (Euglenophyceae. *Journal of Phycology* 1988; 24(4): 520-528.

Page FC, Blanton RL. The Heterolobosea (Sarcodina, Rhizopoda), a new class unitting the Schizopyrenida and the Acrasidae (Acrasida). *Protistologica* 1985; 21(1): 121-132.

Park JS, Kolisko M, Heiss AA, Simpson AGB. Light microscopic observations, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Hicanonectes telesIkopos* n. g., n. sp., a deep-branching relative of diplomonads. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2009; 56(4): 373-384.

Park JS, Kolisko M, Simpson AGB. Cell morphology and formal description of *Ergobibamus cyprinoides* n. g., n. sp., another *Carpediemonas*-Like Relative of Diplomonads. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2010; 57(6): 520-528.

Park JS, Simpson AGB, Lee WJ, Cho BC. Ultrastructure and phylogenetic placement within Heterolobosea of the previously unclassified, extremely halophilic heterotrophic flagellate *Pleurostomum flabellatum* (Ruinen 1938). *Protist* 2007; 158(3): 397-413.

Patterson DJ. *Jakoba libera* (Ruinen, 1938), A heterotrophic flagellate from deep oceanic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1990; 70(2): 381-393.

Patterson DJ. The diversity of eukaryotes. *American Naturalist* 1999; 154: S96-S124.

Patterson DJ, Simpson AGB, Weerakoon N. Free-living flagellates from anoxic habitats and the assembly of the eukaryotic cell. *Biological Bulletin* 1999; 196(3): 381-383.

Roger AJ. Reconstructing early events in eukaryotic evolution. *American Naturalist* 1999; 154: S146-S163.

Roger AJ, Svard SG, Tovar J, Clark CG, Smith MW, Gillin FD, Sogin ML. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that Diplomonads once Harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(1): 229-234.

Silberman JD, Simpson AGB, Kulda J, Cepicka I, Hampl V, Johnson PJ, Roger AJ. Retortamonad flagellates are closely related to diplomonads - Implications for the history of mitochondrial function in eukaryote evolution. *Molecular Biology and Evolution* 2002; 19(5): 777-786.

Simpson AGB. The identity and composition of the Euglenozoa. *Archiv für Protistenkunde* 1997; 148(3): 318-328.

Simpson AGB. Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; 53: 1759-1777.

Simpson AGB, Patterson DJ. The ultrastructure of *Carpediemonas membranifera* (Eukaryota) with reference to the "Excavate hypothesis". *European Journal of Protistology* 1999; 35(4): 353-370.

Simpson AGB, Patterson DJ. On core jakobids and excavate taxa: The ultrastructure of *Jakoba incarcerata*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2001; 48(4): 480-492.

Simpson AGB, Radek R, Dacks JB, O'Kelly CJ. How oxymonads lost their groove: An ultrastructural comparison of *Monocercomonoides* and excavate taxa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2002; 49(3): 239-248.

Simpson AGB, Roger AJ. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Current Biology* 2004a; 14(17): R693-R696.

Simpson AGB, Roger AJ. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2004b; 30(1): 201-212.

Sogin ML. Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal. *American Zoologist* 1989; 29(2): 487-499.

Sterud E. Electron microscopical identification of the flagellate *Spironucleus torosa* (Hexamitidae) from Burbot *Lota lota* (Gadidae) with Comments upon its probable introduction to this freshwater host. *Journal of Parasitology* 1998; 84(5): 947-953.

Stiller JW, Hall BD. Long-branch attraction and the rDNA model of early eukaryotic evolution. *Molecular Biology and Evolution* 1999; 16(9): 1270-1279.

Tamm SL. Free kinetosomes in Australian flagellates. I. Types and Spatial Arrangement. *Journal of Cell Biology* 1972; 54(1): 39-55.

Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Fems Immunology and Medical Microbiology* 2007; 50(1): 1-26.

Wilhelm WE, Anderson JH. *Vahlkampfia lobospinosa* (Craig, 1912) Craig, 1913: Rediscovery of a coprozoic ameba. *Journal of Parasitology* 1971; 57(6): 1378-1379.

Willey RL, Wibel RG. The reservoir cytoskeleton and a possible cytostomal homolog in *Colacium* (Euglenophyceae). *Journal of Phycology* 1985; 21(4): 570-577.

Yabuki A, Nakayama T, Yubuki N, Hashimoto T, Ischida K, Inagaki Y. *Tsukubamonas globosa* n. gen., n. sp., A novel Excavate flagellate possibly holding a key for the early evolution in “Discoba”. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2011 (in press)

Yubuki N, Inagaki Y, Nakayama T, Inouye I. Ultrastructure and ribosomal RNA phylogeny of the free-living heterotrophic flagellate *Dysnectes brevis* n. gen., n. sp., a new member of the fornicata. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2007; 54(2): 191-200.

Yubuki N, Leander BS. Ultrastructure and molecular phylogeny of *Stephanopogon minuta*: An enigmatic microeukaryote from marine interstitial environments. *European Journal of Protistology* 2008; 44(4): 241-253.

Yubuki N, Edgcomb VP, Bernhard JM, Leander BS. Ultrastructure and molecular phylogeny of *Calkinsia aureus*: cellular identity of a novel clade of deep-sea euglenozoans with epibiotic bacteria. *BMC Microbiology* 2009; 9: 16.