

FYLOGENEZE EUKARYOT A DATOVÁNÍ VZNIKU EUKARYOTICKÝCH SKUPIN (Protistologie 2017)

Tento text obsahuje veškeré informace potřebné ke zvládnutí otázek týkajících se výše zmíněných témat na zkoušce z protistologie. Při zkoušce nebude kladen důraz na znalost přesných hodnot – počet druhů atd. – ale na pochopení problematiky jako celku. Poznámky pod čarou a drobný text slouží k doplnění hlavního textu a nebudou u zkoušky vyžadovány.

Na prvním snímku je znázorněno nezakořeněné schéma pěti říší. O monofylii opisthokont, amoebozoí a archaoplastid dnes nikdo nepochybuje. Sporné zůstávají skupiny Excavata a Chromista.

Pro hypotézu, že **Excavata** představují skupinu na nezakořeněném stromu eukaryot (klan), máme zatím stále jen slabé a nepřímé důkazy. I při použití 143 genů a důmyslných postupů při fylogenetické analýze nevytvořila Excavata skupinu na stromu. Problematická je hlavně pozice rodu *Malawimonas*, který má silnou tendenci větvit se mimo ostatní Excavata. Tento stav může být způsoben tím, že *Malawimonas* tvoří na fylogenetických stromech velmi krátké větve (v jeho sekvencích zřejmě dochází k substitucím pomaleji). Naopak mezi ostatními exkaváty se vyskytují velmi dlouhé větve zejména u trichomonád a diplomonád. Zřejmě se jedná o zrychlení substituční rychlosti v důsledku přechodu na anaerobní a parazitický způsob života. Vždyť i morfologicky jsou diplomonády a trichomonády velmi odvozená Excavata. Existence velkých rozdílů v délkách větví představuje problém pro statistiky, které konstruují tvar stromu. Obvykle mají tendenci dlouhé větve sdružovat (říkáme tomu „přitahování dlouhých větví“ - LBA). Nicméně, při použití určitých (povolených) machinací s daty se podařilo ukázat, že Excavata klan tvoří.

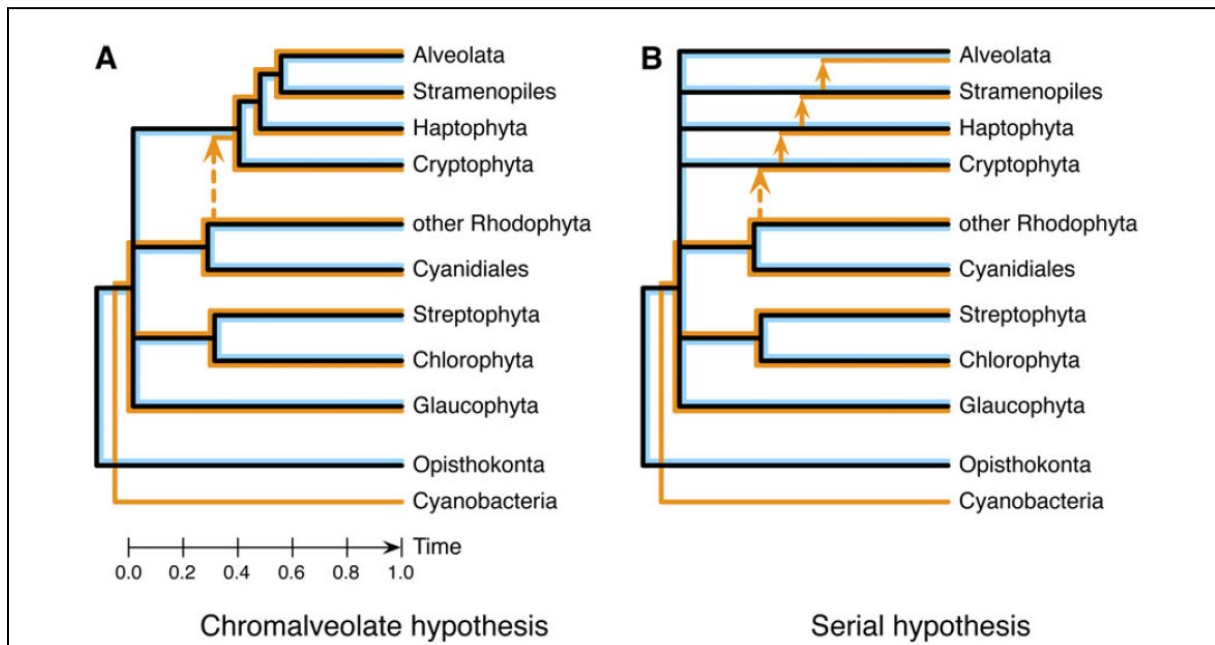
Jestliže byly v analýze ponechány všechny taxony, ale z genů, kde trichomonády a diplomonády vykazovaly nejdelší větve, byly jejich sekvence vypuštěny, vznikl na stromu klan exkavát s malou statistickou podporou 54.¹ Poté, co byly z analýzy zcela vyřazeny taxony diplomonád a parabasalidů, se podpora pro Excavata (ovšem teď již nekompletní) zvýšila na 69 a po vypuštění skupiny Preaxostyla dokonce na 90. Poměrně vysokou podporu pro skupinu Excavata (bootstrap 83) se podařilo získat v analýze, do které autoři zahrnuli sice méně genů, ale mnohem více taxonů.²

V případě „**chromist**“ se podařilo celkem jednoznačně ukázat příbuznost skupin Stramenopila, Alveolata a Rhizaria, společně nazývaných SAR. Existenci tohoto kládu potvrzuje i paralogie v genu pro GTPazu RAB1. U zástupců těchto skupin se totiž vyskytují 2 paralogy tohoto genu. K jejich vzniku, bifurkaci ze společného předka, tedy zřejmě došlo u společného předka těchto skupin. Zbylé skupiny společně označované jako Hacrobia (skrytěnky, haptofyta, centrohelidi a *Telonema*) jsou mnohem více problematické. Některé mnohagenové analýzy je jako skupinu potvrdily, a byl dokonce nalezen jeden vzácný molekulární znak - přítomnost bakteriálního genu pro ribozomální protein rpl36, který u jejich společného předka nahradil původní plastidový gen. Poslední fylogeneze založené na téměř 250 genech ovšem poměrně přesvědčivě ukázala, že tomu tak není a že zatímco se haptophyta větví se skupinou SAR, Cryptophyta a Katablepharida se větví se skupinou Archaoplastida. Ostatní skupiny do analýzy zařazeny nebyly. Zatím tedy nelze než konstatovat, že postavení skupiny „Hacrobia“, zejména pak skrytěnek a katablepharidů je problematické vzhledem k existenci velkého klanu chromista. Postavení skrytěnek po boku archaoplastid však nedává dobrý smysl z morfologického hlediska, protože skrytěnky přeci jen sdílí určité znaky se SAR – ruduchový sekundární plastid obklopený endoplazmatickým retikulem, mastigonemata na bičíku – a ani ruduchům ani zeleným řasám se nepodobají. Fylogenetické vztahy chromistních skupin představují v současnosti asi největší hádanku molekulární protistologie. Neschopnost ukázat, že se jedná o jednotnou skupinu, naznačuje, že historie chromistního plastidu (o jehož jednotném původu nikdo nepochybuje), byla patrně

¹ Číslo 54 na uzlu představuje hodnotu tzv bootstrapu. Bootstrap je statistiky pohybující se od 0 do 100, která vyjadřuje věrohodnost daného uzlu. Čím vyšší hodnota tím je uzel věrohodnější.

² Achilovou patou této studie je, že mnoho taxonů bylo ve skutečnosti v datech zastoupeno málo, často jen jedním genem. Navíc v takovýchto několika genových analýzách (na rozdíl od mnohagenových) záleží mnohem více na výběru genů, které byly do analýzy zařazeny.

složitější. Nebyl získán jednou endosymbiotickou událostí u společného předka všech chromist (schéma vpravo), ale spíš se šířil mezi chromisty pomocí několika endosymbióz vyššího řádu (seriální hypotéza), jak ukazuje schéma vlevo.



I když nejsme schopni rozuzlit příbuzenské vztahy mezi chromisty a archaeoplastidy. Zdá se být poměrně jasné, že se jedná o příbuzné skupiny. Uzel společný pro tyto dvě říše má v multigenových analýzách obvykle velmi silnou až maximální podporu. Cavalier-Smith nazývá tuto nadskupinu **Corticata**. Všiml si totiž, že kortikální alveoly – měchýřky pod povrchem buňky, které ji zpevňují – se vyskytují nejen u alveolát, kde byly jako první homologizovány a označeny za společný znak, ale u mnohem většího množství skupin chromist a archeoplastid – glaukofyt, telonemy, haptophyt, raphidophyt, aktinofrydických slunivek a konečně také u radiolárií může být ektoplasma homologická alveolu. Pokud jsou skutečně všechny tyto kortikální měchýřky homologické, pak lze skutečně hypotetizovat, že se vyvinuly již u společného předka archaeoplastid a chromist, odtud název nadskupiny Corticata.

Podařilo se nashromáždit solidní důkazy, že dvě říše – Opisthokonta a Amoebozoa – jsou sesterské, nevyskytuje se mezi nimi kořen eukaryotického stromu, a proto tvoří monofylum. Pro monofylii této skupiny svědčí mnoho fylogenetických analýz, ale také důkazy založené na vzácných evolučních událostech.³ Takovou událostí je fúze tří genů kódujících tři z enzymů biosyntézy purinových nukleotidů. Tyto geny jsou fúzované u všech studovaných zástupců této skupiny. Dalším znakem podobného typu je existence pěti typů myozinu⁴, které najdeme jen u této skupiny. Nadskupina Opisthokonta a Amoebozoa se nazývala Unikonta, tento název ovšem podsouvá představu, že se jedná o skupiny původně s jedním bičíkem a jedním bazálním tělískem. Takový názor původně skutečně panoval, ale dnes se to jeví jako dost nepravděpodobné, protože jak u opisthokont tak u amoebozoí se vyskytuje mnoho (dokonce většina) organismů se dvěma bazálními tělísky. Proto se objevují nové návrhy na nové označení této nadskupiny, jako **Podiata** nebo **Amorphea**. Oba vychází z toho, že se u této skupiny vyskytuje améboidní morfologie a tvorba pseudopodií. My se zde

³ Takových událostí, u kterých je nepravděpodobné, že by k nim došlo opakovaně, nebo že došlo k jejich reverzi – fúze genů, získání genu mechanismem laterálního genového transferu aj. Pokud organismy sdílí znaky vzniklé při takové události, je velmi pravděpodobné, že měli výlučného společného předka, u kterého k této události došlo. To znamená, že je nepravděpodobné, že tyto organismy jsou nepříbuzné nebo že mezi nimi leží kořen stromu. To bychom totiž museli připustit opakování téže události u různých linií nebo její reverzi.

⁴ Přesněji pět unikátních kombinací domén ve struktuře myosinu.

přidržíme termínu Amorphea. Sesterká Amorpheím je několik skupin, které jsme mi označovali jako *incertae sedis*, Cavalier-Smith je řadí do vývojového stupně Sulcozoa – Breviatea, apusomonády, ancyromonády, collodictionidi a rigifilidi.

Kořen eukaryot

Určit postavení kořene eukaryotického stromu, tedy místa, kde strom „začíná“, je z různých důvodů ještě obtížnější než určit příbuzenské vztahy mezi skupinami. Lze říci, že ve hře jsou dnes čtyři pozice:

1. Na větvi vedoucí k archaeplastidům

Zajímavá současná práce Eugena Konina a jeho týmu přinesla výsledky celogenomových analýz inzercí a delecí (tzv. indelů) a vzácných substitucí v proteinech eukaryot (technické aspekty analýzy ponecháme stranou). Na základě těchto dat autoři kladou kořen eukaryot mezi Archaeplastida a ostatní eukaryota. Přesvědčivost tohoto závěru bohužel oslabuje chabé zastoupení kriticky důležitých skupin eukaryot – autoři pro ně neměli k dispozici příslušná data, protože sekvenování genomů těchto organismů pokulhává. Přesto se tato metoda jeví jako slibná, až budou dostupné rozsáhlejší a vyváženější soubory sekvenčních dat.

2. Na větvi vedoucí k jakobidům

Na tuto polohu se usuzuje proto, že jakobidi (zejména *Reclinomonas americana*) mají nejkompletnější známý mitochondriální genom. Ten obsahuje dokonce původní (eubakteriální) RNA polymerázu, která byla u všech ostatních eukaryot nahrazena polymerázou z fága T4. Nabízí se interpretace, že mitochondrie jakobidů je primitivní znak, takže by měli být u kořene. Pokud by tomu tak nebylo, muselo by dojít v několika eukaryotických liniích nezávisle na sobě k nahrazení původní bakteriální RNA polymerázy polymerázou T4 z téhož fágového zdroje.

3. Mezi skupinou Amorphea a Corticata+Excavata (bez Malawimonas)

Na tuto, z mého pohledu nejpravděpodobnější pozici kořene, ukazuje nedávná multigenová analýza založená na asi 39 genech, které ač nejsou kódovány mitochondriálním genomem velmi pravděpodobně pochází z mitochondriálního⁵. Autoři do této analýzy zahrnuli také α -proteobakterie jako tzv. outgroup, jehož poloha na stromu by měla ukazovat polohu kořene eukaryot. Použili nejlepší dostupné statistické postupy a podařilo se jim s velkou jistotou zakořenit eukaryota tak, že na je jedné straně leží Amorphea, Sulcozoa a excavát *Malawimonas* a na straně druhé Corticata a zbytek excavát.

K čemu je vlastně dobré pátrání po kořeni stromu? Budeme-li znát jeho pozici, můžeme odvodit, jak asi vypadal poslední společný předek dnes žijících eukaryot (LECA). Pokud kořen eukaryot skutečně leží na pozici podle bodu 3. nebo 2. tak to znamená, že LECA byl pravděpodobně excavátní bičíkovec. Na obou stranách od kořene se totiž vyskytují typicky excavátní bičíkovci a pravděpodobnost, že natolik podobný buněčný plán objevil v evoluci dvakrát nezávisle na sobě je velmi malá. Na to, že LECA vypadal jako exkavát poukazuje studie Yubukiho a Leandra⁶. Ti se pokusili homologizovat mikrotubulární kořeny asociované s bičíky napříč všemi eukaryotickými říšemi. Všimli si především zástupců, jejichž morfologie se jeví jako nejméně odvozená. Dospěli k názoru, že exkavátní cytoskelet je pravděpodobně tím nejpůvodnějším uspořádáním, neboť každá jeho součást se kromě excavát vyskytuje ještě u některé z dalších eukaryotických skupin, takže (je-li homologická) měla by být přítomna u společného předka eukaryot.

⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=derelle%20elias>

⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398214>

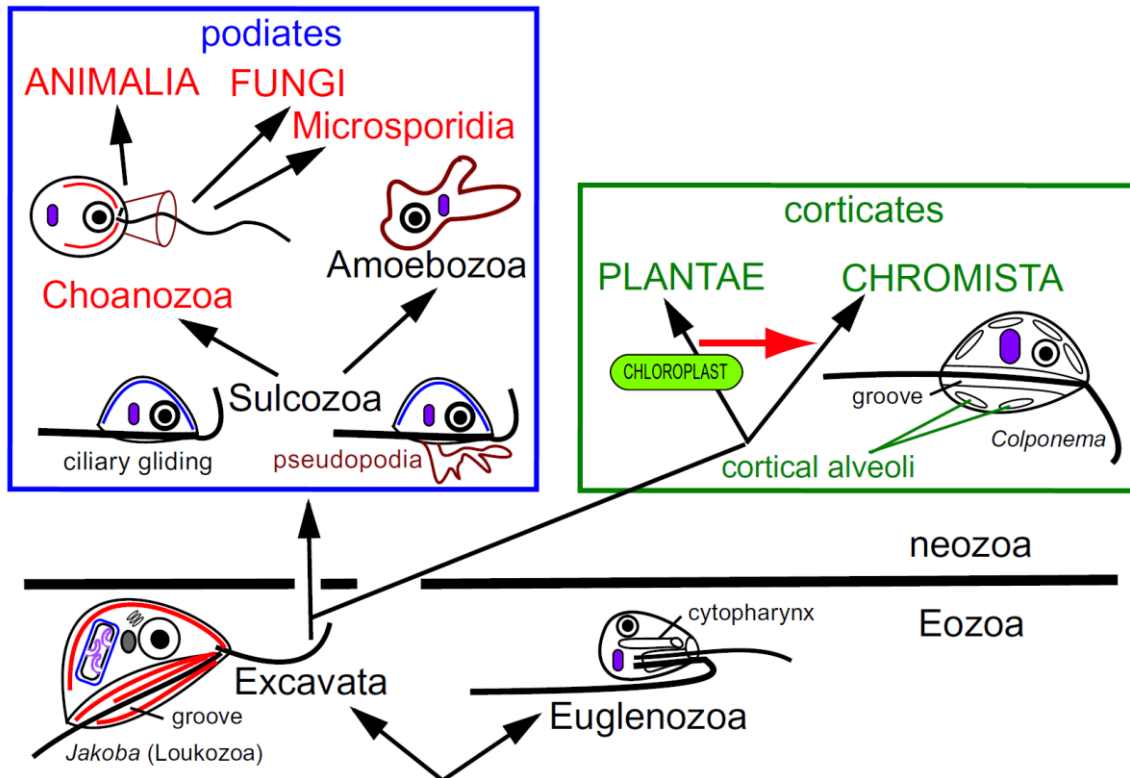
Detailní představa o evoluci eukaryot (Cavalier-Smith 2015)

Nyní si představíme dopodrobna propracovanou hypotézu o evoluci velkých eukaryotických skupin podle Cavaliera-Smitha. Tuto hypotézu zde uvádím nikoli proto, abyste se ji detailně naučili. To skutečně není potřeba, protože si můžeme být téměř jistí, že tato hypotéza nebude ve všech ohledech správná. Berte to prosím, jako příležitost ke zopakování si eukaryotických skupin z trochu jiného pohledu a v jiných souvislostech.

Takže, Cavalier-Smith předpokládá, že kořen eukaryot leží na větvi vedoucí k euglenozoím (máme tu tedy 4. návrh na pozici kořene). První dichotomií jsou tedy Euglenozoa na straně jedné a všechna ostatní eukaryota na straně druhé. Jak tedy vypadal první eukaryot nevíme, ale od něj se evoluce rozběhla dvěma směry (i) ke dvojbíčíkovcům, kteří lezli po površích pomocí zpětného bičíku a pomocí cytostomu umístěného poblíž povrchu odlupovali bakterie a pohlcovali je (dnešní euglenozoa) a (ii) k exkavátním dvojbíčíkovcům, plovoucím či přisedlým, kteří si vytvořili mělký břišní rýhu, skrze níž zpětný bičík vybavený ploutvičkou proháněl proud vody. Podle tohoto scénáře nelze usoudit, který z těchto způsobů obživy byl původně u LECA. Excavata divergovala do všech nám známých exkavátních skupin a jedna linie vedla ke vzniku všech zbylých eukaryot.

Všimněte si, že přestože Excavata nejsou ve schématu monofyletickou skupinou ale skupinou parafyletickou (vybíhají z ní ostatní eukaryota). V tomto ohledu se Cavalier-Smith shoduje s tím, k čemu jsme se dopracovali na předchozí straně.

Nejprve prozkoumáme linii vedoucí k podiátům, které my označujeme Amorphea. Tato linie se záhy naučila tvořit panožky, kterými vyplnila břišní rýhu zděděnou po exkavátech a vznikla Sulcozoa, vývojový stupeň před Amorphea. Stali se z nich lezci po površích, kteří se pohybovali lezením po zpětném bičíku a panožkami v břišní rýze pohlcovali kořist. Ze sulkozoí se vyvinula amébozoa poté,



co se naučila vytvářet panožky na celém povrchu těla a pohybovat se pomocí nich nebo pomocí lezení po předním bičíku. Opisthokonta vznikla ztrátou předního bičíku (zachováním bazálního tělíska) a vznikem filopodií používaných k filtrování nebo přímo lovu kořisti.

Druhou linií eukaryot, která povstala z excavátního předka Corticata. Zde byla hlavní inovací změna kortexu buňky, který si tito prvoci vypořádali alveoly. První kortikát mohl vypadat jako dnešní *Colponema*, jejíž postavení mezi eukaryoty je dosud nejasné, ale má vyvinuty jak kortikální alveoly, tak zachováno něco jako exkavátní rýhu. Pohlcením primárního plastidu vznikla říše Archaeplastida. Druhou linií eukaryot, která v této linii vznikla, jsou Chromista, jejíž někteří zástupci museli nějakou dosud neobjasněnou cestou získat komplexní ruduchový plastid.

Všimněte si, že příbuzenské vztahy na tomto složitém schématu odpovídají těm na našem schematickém stromu, pokud jeho začátek umístíme na větev euglenozoi. Dále si můžete všimnout, že Cavalier-Smith ve svém schématu uvádí spoustu názvů pro skupiny, se kterými jste se v naší přednášce nesetkali. Nenechte se tím znepokojit, on miluje vytváření názvů, rozhodně se je neučte.

Fosilní záznam

Odhady, kdy vznikla eukaryota, se velmi liší mezi autory. Pohybují se od -2,7 miliardy let, kdy se objevují v horninách první stopy po eukaryotických sterolech, až po 1 miliardu let, kdy se objevují ve fosilním záznamu první fosílie, o kterých ani největší skeptici (Cavalier-Smith) nepochybuji, že se jedná o eukaryota. V následujícím textu se pokusím shrnout různé typy důkazů o tom, kdy vznikla jednak eukaryota a také hlavní eukaryotické skupiny.

Mikrofosílie, které jsou zřejmě eukaryotického původu, ale nelze je zařadit do žádné známé eukaryotické skupiny, se nazývají **akritarchy** (z řeckého „ákritos arch“ – nejistého postavení). Na to, že jsou to objekty eukaryotického původu, se usuzuje z toho, že jsou větší velikosti než prokaryotické buňky a jejich povrch (pravděpodobně buněčná stěna) vykazuje pravidelnou složitou strukturu, u které není známo, jak by mohla vzniknout geologickými procesy. Obvykle se také provádějí analýzy poměru izotopů uhlíku ^{12}C a ^{13}C , které určí, zda se jedná vůbec o objekt organického původu. V organických materiálech je izotop ^{13}C zastoupen v menší míře oproti anorganickému okolí, protože enzym RuBisCO fixující atmosférický uhlík do organických sloučenin si přednostně vybírá oxid uhličitý s izotopem ^{12}C .

Nejstarší akritarchy jsou velmi překvapivě staré – 3,2 miliardy let (snímek 24). Javaux a kolegové našli tyto fosílie v jihoafrickém masivu Moodies, který obsahuje nejméně metamorfované horniny tak vysokého stáří. Ostatní takto staré horniny prošly metamorfózou, takže se v nich větší mikrofosílie nemohly zachovat. Další fosílie, které našli Albani a kolektiv jsou datovány na -2,1 miliardy let. V tomto případě se jedná o velké makroskopické objekty, které budí dojem mnohobuněčného nebo koloniálního organismu (snímek 25). Od doby -1,5 miliardy let se ve fosilním záznamu vyskytuje množství akritarchů – např. *Tappania plana*, *Valeria lophostriata*, *Dictyosphaera*, *Satka favosa* (snímek 26). První známé eukaryotické fosílie (opět akritarchy) nalezené v sedimentech, které jsou prokazatelně sladkovodního původu jsou staré asi 1 miliardu let. První zařaditelnou fosílií (tedy ne akritarchem) je *Bangiomorpha* velmi podobná dnešní ruduše *Bangia*, která se datuje na -1,2 miliardy let (snímek 27). Vzhledem k vysokému stáří ovšem mnozí pochybují, že se jedná o ruduchu, a považují tuto fosílii za koloniální sinici.

V neoproterozoiku a zejména v jeho prostředním období cryogenianu začal ten pravý eukaryotický kvas a začaly se objevovat fosílie zařaditelné do dnes známých skupin. Ve vrstvách starých -1,0 až -0,75 miliard let se nachází vláknité řasy *Paleovaucheria*, které se podle větvení a přeřádkování stélek řadí ke xantophytům (snímek 29). První fosílie zelených řas, *Proterocladus*, je datovaná -750 milionů let (snímek 30). Od -800 milionů let se vyskytují vázovité fosílie téměř identické dnešním schránkám améb (snímek 31). Je možné, že nastartování eukaryotické evoluce v tomto období souvisí s oxysličováním oceánů. Období anoxického sulfanového Canfieldova oceánu končí a koncentrace kyslíku se postupně dostává na dnešní hodnoty. V cryogenianu došlo také ke dvěma, možná dokonce třem, velkým zaledněním Země. Podle některých názorů se Země změnila doslova ve sňehovou kouli (“Snowball Earth”), protože byla na celém svém povrchu (souši i mořích) pokryta vrstvou sněhu

a ledu. Podle některých názorů nebylo zalednění úplné a na rovníku byla roztátá. Toto zalednění samozřejmě výrazně ovlivnilo Život. Eukaryota sice přežila, ale složení fosilií se pochopitelně změnilo, nicméně stále se vyskytují vázovité fosílie krytének a pod. Jako příklad (obr. 32) uvádím akritarchy, které jsou považovány za klidová stadia řas. Srovnejte s dnešní hypnozygotou obrněnek.

S kambrijskou explozí bilaterálií se objevují i další dnes známé skupiny protist. Ve fosilním záznamu se objevují dírkonošci v podstatě dnešního typu. Z fototrofních eukaryot v oceánech zřejmě dominovaly zelené řasy. Nástup chromistních skupin řas, které v současnosti v mořích převládají, je patrný až na konci prvohor a během druhohor. Ústup zelených řas dává jedna teorie do souvislosti s poklesem koncentrace CO₂. Chromistní řasy jsou údajně schopny při nižších koncentracích CO₂ růst lépe než řasy zelené.

Snímek 34 má ukázat, že hromadná vymírání, jako to na rozhraní křídly a terciéru, kdy vyhnuli dinosauři, se dotkla i protist. Je to ukázáno na příkladu dírkonošců. Mnohé jejich skupiny se po tomto vymírání ve fosilním záznamu ztrácí, ale objevují se skupiny nové.

Molekulární datování

Jinou metodou, jak odhadnout stáří skupin (uzlů na stromu života) jsou molekulární hodiny. Ty vycházejí z předpokladu, že počet substitucí, ke kterým došlo v sekvencích DNA a aminokyselin, odráží uplynulý evoluční čas. Nebudu zabíhat do podrobností, ale je zřejmé, že výsledek takového odhadu je velmi závislý od toho, jaké předpoklady⁷ statistické metody používají, a změna jakéhokoli z nich může velmi ovlivnit výsledný odhad. Výsledkem těchto metod nejsou přesná data ale poměrně široké intervaly. V závislosti na zvolené metodě se intervaly vzniku eukaryot a jednotlivých skupin pohybují následovně:

Vznik eukaryot	1,9-1,4 miliard let (podle některých metod 2,4-0,9 miliardy let)
Amoebozoa	1,8-1,0 miliard let
Excavata	1,9-1,3 miliard let
Opisthokonta	1,5-0,6 miliard let
SAR	1,7-1,1 miliard let

Shrneme-li dostupné indicie, můžeme prohlásit, že poslední společný předek všech dnes známých žijících eukaryot žil někdy v době před 1-1,9 miliardou let. První eukaryota se však objevila mnohem dříve, zřejmě již před 2,7 miliardou let (stopy sterolů) nebo ještě dříve (nález akritarchů v masivu Moodies). Eukaryota, tedy dělí od prokaryot „stonek“ dlouhý více než miliardu let. Akritarchy z období před 1,0 miliard let zřejmě představují zástupce vyhynulých linií, které se oddělily od tohoto stonku.

⁷ Pod předpoklady si můžeme představit např. pravděpodobnosti různých typů záměn v DNA a aminokyselinách, míru proměnlivosti substituční rychlosti a její rozdílnosti mezi větvemi stromu, tvar stromu, ze kterého odhad vychází a postavení jeho kořene a konečně kvalita a množství kalibračních bodů (míst na stromu o známém stáří), které jsou k dispozici.