

OPISTHOKONTA

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

Skupina Opisthokonta byla rozpoznána již poměrně dávno (Cavalier-Smith, 1987). Opisthokonta jsou jednoznačně druhově nejbohatší z 6 eukaryotických „megagroup“. To proto, že jsou doménou velkých mnohobuněčných skupin – živočichů a hub. Na prvočí organismy jsou ovšem opisthokonta poměrně chudá a nalezneme zde jen několik méně významných prvočích linií. Prvočí linie příbuzné živočichům se někdy společně nazývají Choanozoa, ale je zřejmé, že tvoří monofyletickou skupinu. Tyto skupiny jsou zajímavé především z evolučního pohledu při studiu vzniku mnohobuněčnosti hub a především metazoi. Opisthokontům jsou s velkou jistotou příbuzné dvě neopisthokontní skupiny prvoků – apusomonády a breviáti. Tyto tvoří společně s opisthokonty skupinu **Obazoa** (Opisthokonta+Breviatea+Apusomonadida).

Společné znaky opisthokont

Do skupiny opisthokonta spadají eukaryota, která mají, nebo jejichž předci měli, dvě bazální tělíska, z nichž jedno je holé a druhé nese tzv. **zadní bičík**. Zadní se nazývá z toho důvodu, že na rozdíl od ostatních eukaryot žene tekutinu směrem od buňky, a buňku tak tlačí před sebou, pokud tedy není ukotvena jako v případě některých choanoflagelátů. U metazoi jsou bičíky zachovány na spermiích a na buňkách řasinkových epitelů, plaménkových buněk aj., u hub je to pouze na sporách chytridiomycet, které představují nejprimitivnější skupiny hub. Dalšími charakteristickými znaky opisthokont je **častá přítomnost chitinu**. Ten se nachází v buněčných stěnách hub, exoskeletu členovců a buněčných stěnách mesomycetozoi. Jako zásobní sacharid používají opisthokonta **glykogen**. Typické jsou také **ploché mitochondriální kristy**. Až na naprosté výjimky nenajdeme mezi opisthokonty fotosyntetické zástupce. Množství molekulárně fylogenetických analýz celkem jednoznačně ukazuje, že opisthokonta jsou monofyletická skupina. Silným důkazem, pro existenci této skupiny je rovněž inzerce několika aminokyselin v genu pro EF-1alfa, která se nachází u všech studovaných opisthokont a nenajdeme ji u ostatních eukaryot. Tomuto typu molekulárních znaků je obvykle přisuzována velká váha, protože je málo pravděpodobné, že by vznikly několikrát nezávisle nebo že by došlo k reverzi. Je tedy velmi pravděpodobné, že organismy, které takové znaky sdílí, měly výlučného společného předka, u kterého takový znak vznikl. Příbuzenské vztahy v rámci opisthokont se v posledních letech poměrně vyjasnili (schéma na snímku č. 6). Jedinou větší neznámou je pozice rodu *Corallochytrium*.

Polyfyletická skupina (taxon) – je skupina sdružující organismy, které si jsou zcela nepříbuzné. Většinou tam byly zahrnuty na základě povrchní podobnosti, která vznikla konvergentní evolucí. Takovéto skupiny jsou mezi evolučními taxonomy zcela zakázané. Příkladem je skupina bývalá skupina kořenonožci (zahrnuje améby patřící do skupin Amoebozoa, Rhizaria, Excavata atd.) řasy (Plantae, krásnoočka, Chromista), červi (nematodi, ploštěnci).

Parafyletická skupina (taxon) – je taková skupina, jejíž zástupci sice mají společného předka, ale tento předek má i potomky, kteří do této skupiny nepatří. Často jsou to „vývojové stupně“. Např. plazi (protože mezi ně by měli patřit i ptáci, sesterská skupina krokodýlů), ryby (měli by sem patřit i všichni tetrapodi, sesterští k bahníkům a s nimi k latimérii). Choanozoa z předešlého snímku jsou také parafyletická skupina. Někteří taxonomové parafyletické skupiny uznávají, jiní (zejména kladisti) ne.

Monofyletická (holofyletická) skupina (taxon) - Nejideálnější stav. Třeba savci. I my se snažíme vám představovat především monofyletické skupiny. Monofyletická je např. skupina Holozoa z předešlého snímku.

Kontrolní otázka: Jak můžeme v praxi odlišit parafyletický taxon od polyfyletického? Vždyť i organismy zahrnované do polyfyletického taxonu určitě měly někdy společného předka a tato skupina tedy vyhovuje i uvedené definici parafyletického taxonu: mají společného předka, ale někteří potomci tohoto předka tam nepatří. Abychom tyto dva případy rozlišili, musíme vědět, jak vypadal společný předek. Pokud je možné společného předka také zařadit do tohoto taxonu (např. společný předek plazů byl také plaz, ale z některých jeho potomků se stali savci či ptáci) pak se jedná o parafyletickou skupinu. Pokud společný předek nevykazoval znaky taxonu jedná se o polyfyletickou skupinu. Např., jak vypadal společný předek kořenonožců – první eukaryot – nevíme a nemusela to být améba, společný předek řas také

Nyní se budeme zabývat skupinami náležícími do části stromu obsahující Fungi (houby). Někdo tuto část stromu souborně nazývá Holofungi.

Nucleariida

Améby s tenkými neanastomozujícími filopódiemi připomínají slunivky (kam byly dříve některé z nich klasifikovány). Filopodie nejsou vyztuženy mikrotubuly ale pravděpodobně aktinem. Cytoplasma je kulovitá nebo placatá, u placatých buněk filopodie vychází jen z jedné strany. Na povrchu mohou mít šupiny, nebo oválné křemičité perly (*Pompholyxophrys*). Mají diskovité mitochondriální krysty. Žijí ve sladkých vodách a v půdě, jsou fagotrofní a žerou především řasy a bakterie. *Vampyrellidium* je parazit na řasách. Pozor, není příbuzný vampyrelám, i když se to dříve myslelo.

Fonticula

Organismus s agregativním typem mnohobuněčnosti, který byl původně řazen k acrasidním hlenkám patřícím do Excavata. Podle molekulárně fylogenetických analýz je to opisthokont příbuzný nukleáriím. Byl izolován jediný izolát/druh *Fonticula alba* z psího trusu. Má diskovité mitochondriální krysty. Vyskytuje se ve formě améb s tenkými filopódiemi, které připomínají nukleárie. Améby mohou samostatně vytvářet cysty. Za určitých podmínek dojde k shluknutí améb, které začnou kolem sebe vylučovat extracelulární hmotu a s její pomocí vytvářet kuželovitý útvar. Uvnitř kužele začnou některé améby sporulovat a vzniklé spory jsou posléze neznámým mechanismem vytlačeny na špičku kužele, kde vytvoří velké kulovité sporangium.

Opishosporidia

Nejbazálnější větví na fylogenetickém stromu hub nebo nejbližšími příbuznými hub (v závislosti na tom, zda tyto organizmy počítáme mezi houby) se ukazuje být několik linií organismů jejichž vzájemné příbuzenské vztahy jsou zatím nevyjasněné. Souhrnně je budeme nazývat Opisthosporidia.

První z nich je poměrně bohatá skupina organismů, o kterých zatím nevíme téměř nic nazývaná **Crypromycota**. Od valné většiny z nich známe totiž jen sekvence malé ribozomální podjednotky, které byly získány z environmentální DNA¹ izolované z nejrůznějších vodních prostředí. Fluorescenčním barvením se podařilo zjistit, že se jedná vesměs o drobné organismy (asi 3 μm), jejichž životní cyklus obsahuje bičíkatá stadia. Často žijí přisedle na jiných organizmech, třeba na schránkách rozsivek. Dosud byla jen u jednoho zástupce v jedné fázi životního cyklu detekována buněčná stěna. Jediné sekvence, od kterých víme podrobněji, jak vypadá organizmus, ke kterému patří, náleží rodům *Rozella*. Rod *Rozella* (popsáno již 26 druhů) sdružuje redukované endoparazity chytridimycét (např. *Rozella allomycis*), ale i zelených řas (*Rozella coleochaetis*). Jejich životní cyklus sestává (i) z jednobíčíkatého stadia, kterým se šíří na nové hostitele, (ii) přisedlého stadia na povrchu hostitele, které je schopno injikovat do buňky hostitele svou cytoplasmu (děje se tak expanzí zadní vakuoly – patrná na snímku 13, obr. C – která zvětšuje svůj objem a vytlačuje cytoplasmu tubicí do hostitelské buňky), (iii) amébovitého stadia uvnitř hostitele, které se živí cytoplasmou a organelami hostitele a (iv) konečně z kulovitých sporangií. Sporangia jsou dvou typů. Jednak průsvitnější zoosporangia vyplněná zoosporami, které se z nich uvolňují speciálními kanálky nebo prasknutím sporangia. Dále vytváří rezistentní kulatá sporangia obalená tlustou buněčnou stěnou. Buněčnou stěnu údajně vytváří sama hostitelská buňka na popud parazita.

¹ Více o environmentální DNA najdete v textu Myzozoa, poznámka č. 3

Další linií opisthosporidií jsou **Aphelida**. Z nich bylo popsáno několik rodů *Aphelidium*, *Paraphelidium*. Jejich životní cyklus je v zásadě podobný jako Cryptomycota. Volná stadia jsou bičíkatá nebo amébovitá (*Amoeboaphelidium*). Jedná se často o parazity zelených řas.

Linií opisthosporidií dále přibývá a bude zajímavé sledovat, jak se vyřeší jejich příbuzenské vztahy. Dalšími liniemi, které se nemusíte ke zkoušce učit, jsou rody *Nucleophaga*, *Paramicrosporidium*, *Mitosporidium*.

Jednoznačně největší skupinou opisthosporidií jsou **Mikrosporidie**, které dovedly infekční mechanismus do dokonalosti. Skupina zahrnuje asi 1200 druhů (144 rodů). Všechno jsou to vnitrobuněční paraziti s velmi pozměněnou stavbou buněk. Často velmi drobní – nejmenší spory jsou veliké 1µm. Napadají mnoho skupin živočichů (i člověka), ale nejčastěji hmyz. Nemají bičíky ani bazální tělíska. Typickým útvarem pro mikrosporidie je spora (obr. a,b), která obsahuje stočené pólové vlákno (pf) a další útvary sloužící při infekci. Je obalena dvouvrstevnou stěnou (vnitřní vrstva obsahuje chitin). Spory jsou uzpůsobené k injikaci cytoplazmy s jádrem (nukleoplazmy) do hostitelské buňky. Tento proces probíhá následovně. Jakmile se spora ocitne v hostiteli, např. s potravou, zvýší se ve spoře osmotický tlak (štěpení polysacharidů) a zejména do bobtnavého tělesa pod polárním vláknem začne pronikat voda a těleso expanduje. Vzniklý tlak **vytlačuje duté polární vlákno ven** z buňky a obrací ho přitom naruby (jako by šlo o rukáv původně vtažený dovnitř svetr). Vlákno je schopné proniknout **skrz povrch hostitelské buňky**. Posléze je **vláknem protlačen i buněčný obsah spory** – cytoplazma s jádrem. Membrány polaroplastu slouží právě k „povlečení“ vytlačené cytoplazmy membránou a jejímu obalení v cytoplasmě hostitele. Polaroplast je tedy předpřipravená buněčná membrána. Od hostitelské cytoplazmy je parazit oddělen často jen svou vlastní membránou (ale někdy je kolem něj i další – tzv. parazitoformní vakuola). Mikrosporidie hostiteli **odebírají přímo ATP a další živiny**. V cytoplasmě hostitele žije mikrosporidie jako meront, který vypadá jako beztvaré plazmódium. Roste a množí se. Nakonec dojde ke vzniku spor (sporogonie), které se vysypou z hostitelské buňky, když ta praskne. Uvolněné spory mohou vystřelit a infikovat další buňky, nebo být vyplaveny do volného prostředí a čekat na dalšího hostitele. Někdy mají mikrosporidie dvoujaderná stadia. Možná se jedná o homologii dikaryonu eumykot. Mitochondrie mikrosporidií je redukována na malý váček – mitozom. Mají také nejmenší známý eukaryotický genom (2,9 Mb u *Encephalitozoon cuniculi*). **Nejvýznamnější zástupci mikrosporidií jsou: Nosema**, paraziti hmyzu – škůdci včel, bourců, ale využitelní pro biologický boj, a *Encephalitozoon*, parazituje i u člověka (problém u imunosuprese, např. AIDS).

Mikrosporidie byly dlouho považovány za jedny z nejprimitivnějších eukaryot. Byl to hlavně důsledek jejich jednoduché buněčné stavby a fylogenetických analýz založených na sekvencích 18S rRNA, kde se odvíjevaly jako jedna z prvních větví eukaryot. Tato pozice je však s velkou jistotou způsobena artefaktem přitahování dlouhých větví (LBA) – viz první přednáška. 18S rRNA mikrosporidií je velmi krátká a odlišná od ostatních eukaryot. Příčinou však zřejmě není dávné odvětvení této skupiny ale „zrychlená“ evoluce tohoto genu, která pravděpodobně souvisí s drastickou změnou morfologie a životní strategie mikrosporidií (z hub na vnitrobuněčné parazity). Artefakt LBA přitahuje takto pozměněnou sekvenci směrem ke kořeni stromu k prokaryotickým sekvencím, které se na tomto stromu (přirozeně) chovají jako ty nejdelší dlouhé větve, protože jsou nejvíce vzdáleny od eukaryot. Až proteinové sekvence pro tubuliny ukázaly, že se jedná o velmi pozměněné příbuzné hub. Dnes se domníváme, že jsou mikrosporidie sesterské houbám společně se skupinou Cryptomycota.

Fungi (houby)

Definovat houby není snadné. Všechny znaky, které nás napadnou, se obvykle vyskytují i někde mimo houby u skupin, které často kdysi byly do hub řazeny (Oomycota, hlenky (Myxozoa), plamodiophory, labyrinthuly ani Hyphochytriomycota, Ichthyosporea). Navíc některé „houbové“ znaky nacházíme jen u

největší skupiny eumykota a bazální skupiny hub jako jsou zygomycety a především chytridiomycety je porušují. S přimhouřením oka můžeme tvrdit, že pro houby je typická chitinová buněčná stěna, glykogen jako zásobní látka, tvorba hyf, absence bičíkatých stádií, přítomnost dvoujaderných stádií a saprofytický nebo parazitický způsob života. Saprofytizmus znamená, že houby nepolykají velké kusy potravy fagocytózou, ale tráví substrát extracelulárně a natrávený substrát nasávají do buněk. Houby se rozmnožují pohlavně i nepohlavně. Dnes známe asi 100 000 druhů a celkový počet se odhaduje na 5,1 miliónů. Klasicky se houby člení na čtyři skupiny – Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota a největší Eumycota (Basidiomycota a Ascomycota).

Stručný přehled skupin hub - jen pro úplnost, ke zkoušce se to učit nemusíte)

Eumycota: mají dikaryotické buňky (dvě jádra na buňku)

Basidiomycota: spory tvořené na bazidíích

Hymenomyces (rouškaté houby): např. hřib, bedla, choroš, liška, kuřátka, pýchavka,

Ustilaginomyces: sněti

Urediniomyces: rzi

Ascomycota: spory ve vřecích

Euscomycetes: velké množství hub – smrž, kustřebka, „plísň“ (*Aspergillus, Penicillium*), většina lišejníků (samozřejmě jejich houbová složka),...

Saccharomycotina: např. kvasinka *Saccharomyces*

Taphrinomycotina: Parafyletická skupina. Např. kvasinka *Schizosaccharomyces*, dále *Pneumocystis, Taphrina* aj.

Glomeromycetes: Mykorrhizní symbionti rostlin. Např. *Glomus*.

Zygomycetes (spájkivé houby): nyní se rozpadají na nepřibuzné skupiny Entomophthoromycotina (paraziti hmyzu, *Entomophthora*) a Mucoromycotina (primitivní „plísň“, např. *Rhizopus, Mucor*).

Mikrosporidia a chytridie rozebereme podrobněji níže.

Chytridie

Nejprimitivnější houby jak podle molekulárně fylogenetických analýz, tak podle fosilního záznamu (Ediakaran 600 mil let). Je to určitě parafyletická skupina, která se rozpadá na chytridiomycety (např. *Chytrium, Batrachochytrium*), neocallimastigomycety, Blastocladiomycety (např. *Allomyces*) a rod *Olpidium*. Pro všechny tyto linie je typická bičíkatá spora a všechny se větví někde na bázi hub. Proto je pro účely této přednášky spojím do jedné skupiny, kterou budu nazývat chytridie.

Chytridie jsou převážně vodní organizmy (mořské i sladkovodní). Jako jediné houby mají bičíkatá stadia – gamety a zoospory. Většinou jsou jednobuněčné, některé druhy tvoří mnohojaderná cenobia či mnohobuněčná mycélia. Životní cykly se liší skupina od skupiny a obsahují nepohlavní a pohlavní fázi. *Spizellomyces* je typická jednobuněčná chytridiomyceta s rhizoidy a kulovitou buňkou, v níž se posléze tvoří bičíkaté zoospory. Často se vyskytuje na pylových zrnech rostlin. *Neocallimastix* obývá trávicí trakt býložravců a pomáhá hostiteli trávit celulózu. Má mitochondrie přeměněné na hydrogenozomy. Jeho zoospory jsou vícebičíkaté. *Allomyces* (Blastocladales) má mnohobuněčnou stélku a složitější v životní cyklus, ve kterém prochází rodozměnou. Gametofyt produkuje 1n gamety. Sporofyt, který vyrostl ze

zygoty, vytváří jednak 2n zoospory v tenkostěnných sporangiiích, z těch rostou další sporofyty, a jednak 1n zoospory v tlustostěnných sporangiiích (hnědé věci na obrázku), ze kterých vyroste gametofyt. Další významní zástupci chytridií jsou: *Olpidium* (škůdce brukvovitých), *Synchytrium* (rakovinovec bramborový), *Batrachochytrium* (smrtný parazit žab). *Batrachochytrium* vytváří sporangia v kůži žab, spory se šíří vodou.

Ostatní jednobuněčné houby

„Jednobuněčné“ houby nalezneme i mimo bazální chytridiomycota. Mezi askomycetami to jsou **pneumocysty** – jednobuněční plicní paraziti savců dříve řazení mezi prvoky. Pneumocystis se množí v plicních sklípcích jako amébovitě trofozoity. Infekčními stádii jsou spory obsahující 8 sporozoitů, evidentně je toto stádium homologické všem vřeckovýtrusným hub. *Pneumocystis* je tedy sekundárně zjednodušená vřeckovýtrusná houba. Také některé kvasinky jako **kvasinka pивní** (*Saccharomyces cerevisiae*) jsou sekundárně jednobuněčné.

V dalším textu se budeme věnovat části stromu opisthokont, která obsahuje živočichy (Metazoa). Někdy se tato větev nazývá Holozoa. Protistní zástupci (tedy bez metazoí) se společně nazývají Choanozoa.

***Corallochytrium* a *Syssomonas* (Pluriformea)**

Dva rody opisthokont tvořící jednu linii. *Corallochytrium* má jediný druh mořského saprofyta (*C. limacisporum*) izolovaný na korálových útesech v Indickém oceánu. Původně byl klasifikován mezi houby. Kulovité vegetativní buňky (5-20 μm) mohou být samostatné nebo se dělí a vznikají diády nebo tetrády. Uvnitř vegetativních buněk vznikají dceřiné buňky – endospóry, které se uvolňují ven otvory v buněčné stěně mateřské buňky. Uvolněné spory se pohybují jako améby.

Syssomonas je opisthokontní bičíkovec vytvářející i mnohobuněčné shluky. Jeden zadní bičík. Fagotrof, živí se na eukaryotech (bodonidi, zlativky). Izolován ze sladkovodní nádrže ve Vietnamu.

Ichthyosporea (Mesomycerozoa)

Málo prozkoumaná skupina Ichthyosporea se nazývá též Mesomycetozoa nebo ve starší literatuře DRIPs, což je zkratka jmen prvních čtyř poznaných zástupců. Jsou to tkáňoví a vnitrobuněční paraziti převážně vodních živočichů, ale výjimečně i člověka (*Rhinosporidium seeberi*). Některé druhy (*Psorospermium haeckeli* a *Ichthyophonus hoferi*) jsou hospodářsky významní paraziti koryšů a ryb.

Životní cykly jsou málo prozkoumány a jen některé zástupce se podařilo kultivovat v laboratoři. V hostiteli se vyskytují jako velké (kulovité nebo oválné) útvary (1) – sporangia, tj. buňky obsahující mnoho dceřiných buněk – endospór. Když sporangium ve tkáni hostitele praskne nebo se spory dostanou ven speciálními otvory, může z každé endospóry vzniknout nové sporangium. *In vitro* mohou vzniknout pohyblivá stádia – bičíkaté zoospory nebo amébovitě spóry. Podle druhu těchto spor se dělí do dvou řádů – Dermocystida (s bičíkatými sporami, paraziti obratlovců) a Ichthyophonida (s amébovitými sporami, paraziti bezobratlých). Tato stádia mohou sloužit k přenosu mezi hostiteli, ale nikdo je ještě neviděl v přírodě.

Dermocystidium způsobuje smrtelné infekce ryb a dalších mořských živočichů. U ryb parazituje v žábách, kde vytváří kulovitá sporangia, plná endospór. Z endospór vznikají bičíkaté zoospory. ***Rhinosporidium seeberi*** způsobuje rhinosporidíózu – chorobu člověka, savců a ptáků. Ve tkáni (sliznice nosohltanu, kůže a podkoží) se vyskytují kulovitá sporangia, jež dorůstají do velikosti až 450 mikrometrů a obsahují tisíce endospór. Z uvolněných endospór se vytváří nová sporangia. ***Ichthyophonus hoferi***

Parazituje ve tkáních asi 80 druhů ryb – losos, sled'. Způsobuje masové úhyny ryb a má tedy hospodářský význam². Původně byl řazen mezi zygomycety. *Psorospermium haeckeli* napadá pojivovou tkáň v okolí střev u korýšů – Amerika, Evropa a Sibiř. Způsobuje úhyny v chovech.

V České kotlině můžete najít Ichthyosporia například v perloočkách. *Caullerya mesnili* je jedním z nejvýznamnějších parazitů dafnií. Způsobuje pravidelné epidemie ve větších stabilních vodních nádržích v Evropě s prevalencí až 40%. Napadá střevní epitel v horní části střeva, kde se množí v mezi buněčném prostoru. Nakažené perloočky žijí kratší dobu a produkují výrazně méně vajíček. Příbuzný parazit či symbiont byl nalezen v tukovém tělese a nervové soustavě potemníka.

Capsaspora, Ministeria a Pigoraptor (Filasterea)

Jediný druh *Capsaspora owczarzaki* parazituje u plžů (*Biomphalaria glabrata*), kde se vyskytuje v hemolymfě. Původně byla považována za druh rodu *Nuclearia*. *Biomphalaria glabrata* je mezihostitelem krevničků (*Schistosoma*) a *Capsaspora* může hrát roli při rezistenci plžů k larvám těchto motolic – plží, u kterých byly prvoci nalezeni byly více rezistentní a bylo pozorováno, jak *Capsaspora* žere larvu motolice.

Malé mořské améby (název znamená „malá hvězdička“) byly nalezeny na několika lokalitách na pobřeží Tichého a Atlantského oceánu a v Baltském moři. Z těla (asi 5 µm) vychází pravidelně umístěné dlouhé výběžky. *M. vibrans* se umí přichytit výběžkem k povrchu a vibruje – jedná se zřejmě o modifikovaný bičík. Tenké výběžky nejsou vyztuženy tubulinem, ale je v nich filament, pravděpodobně aktinový. Původně řazená k nucleariidům. Sesterská skupina rodu *Capsaspora*.³

Opisthokontní bičíkovec občas vytvářející tenká filopodia izolován ve sladkovodních nádržích ve Vietnamu a Chile. Eukaryovorní predátor fagocytující bodonidy. Dva popsání druhy *P. vietamica* a *P. chiliana*.

Choanoflagellata

Skupina zahrnuje asi 250 druhů z toho asi 200 mořských. Jedná se o bičíkovce žijící jako přisedlé samostatné buňky nebo v koloniích. Jednoznačným poznávacím znakem je límce z mikrovilů. Proud vody poháněný pohybem bičíku využívají k filtrování potravy. Baktérie se zachycují na vnější straně svého límce a jsou pohlcovány pomocí panožek, které se vytváří na protoplastu na vnější straně u báze límce⁴. Mikrovily límce jsou vyztuženy vlákny aktinu. Uspořádání cytoskeletu a organel uvnitř buňky je také poměrně jednotné v rámci celé skupiny. Z bazálního tělíska nesoucího bičík paprscitě vybíhají vlákna mikrotubulů, které sahají až z bázi mikrovilů, na kterou jsou napojeny zvláštní fibrilou. Druhé bazální tělísko, které nese žádný bičík je uloženo níže a natočeno v pravém úhlu k bazálnímu tělísku s bičíkem. Buňka choanoflageláta (nazývaná též protoplast) je často obklopen obalem, kterému se říká periplast. Obal může být tvořen buď organickými molekulami (théka) nebo může být tvořen křemičitými žebry (lorika)⁵. Loriku vytváří asi polovina známých druhů, všechny z nich žijí v moři⁶. Choanoflageláti se

² Lze jej kultivovat, při nízkém pH vytváří hyfy, při pH 7-9 vyklíčí mikrospory ze sporangii na koncích hyf v amébkách.

³ Společně se řadí do skupiny Filasterea.

⁴ viz animace na <http://www.biology.ualberta.ca/facilities/multimedia/uploads/zoology/choanoflagellate.html>

⁵ Tvorba loriky je poměrně složitý proces. Buňka nejprve vynese na povrch stavební materiál – svazky žebry (zvláště podélná žebra a zvláště příčná žebra) a potom je v poměrně rychle po povrchu rozmístí a „uplete z nich košík“. Při pletení košíku si buňka pomáhá filopodiemi límce.

vyskytují v různých prostředích – mořská, brakická i sladká voda, jsou pelagičtí i usedlí v bentosu, od arktidy až do tropů. Jsou významnou heterotrofní skupinou v ekosystémech.

Taxonomie choanoflagelátů je založena na obalech a rozděluje je do dvou přirozených skupin:

Craspedida

Zahrnuje nahé druhy nebo druhy vytvářející organický periplast (théku). Vegetativní stádium je většinou přisedlé, volně plovoucí stádia jsou krátkodobá. Známá 22 rodů v jediné čeledi Salpingoecidae. Některé druhy vytváří mnohobuněčné kolonie, ve kterých jsou buňky spojeny cytoplasmatickými můstky a uloženy v organické extracelulární matrix. Příkladem může být *Salpingoeca rosseta*. Životní cyklus tohoto druhu zahrnuje tři solitérní stádia. Stádium „rychlého plavce“ má zkrácený límec mikrovilů a je tak přizpůsobeno k rychlejšímu pohybu. Toto stádium je schopné přisednout a vytvořit si théku (viz. video 1). Děje se to tak, že se k povrchu (na videu je povrchem prázdná théka jiného choanoflageláta) přichytí filopodiemi na přední straně buňky (tj. opačné straně, než je límec a bičík) (video 2). Z filopodií si vytvoří stopku, která se prodlouží a vyroste v průsvitnou pohárovitou théku, která obklopí buňku bičíkovce. Celý proces trvá asi 6 hodin. Přisedlému stádium se prodlouží límec mikrovilů, čímž se zefektivní filtrace. Přisedlé stádium může opustit théku a vznikne stádium pomalého plavce. Pomalého proto, že má dlouhý límec. Při opouštění théky si buňka opět pomůže filopodiemi, kterými se z théky vysune (video 3). Pomalí plavci se mohou dělit, stejně tak jako přisedlé formy. Při dělení přisedlé formy opouští théku je jeden z jedinců (video 4). Pomalí plavci mohou vytvářet kolonie dvou typů – rozety a řetízky. V obou případech vznikají kolonie dělením jednoho jedince, při kterém nedojde k úplnému oddělení buněk, ale ty zůstanou spojeny úzkými cytoplasmatickými můstky a lepkavou vláknitou extracelulární matrix. Kolonie se také mohou dělit (video 5).

Acanthoecida

Choanoflageláti s lorikou tvořenou křemičitými žebry. Žebra vznikají v podlouhlých „silica deposition vacuoles“ a jsou exocytována na povrch. Podle způsobu, jakým si staví loriky se Acanthoecida dělí do dvou monofyletických čeledí, obě jsou mořské:

Acanthoecidae jsou tzv. nudiformní choanoflageláti a zahrnují 4 popsané rody. U těchto choanoflagelátů opouští po dělení jeden z nově vzniklých jedinců (juvenil) loriku. Tento nahý bičíkovec si nejprve vyloučí na svůj povrch kompletní sadu žeber. Pak je plynulým pohybem vpřed za současné levotočivé rotace splete v loriku. Sestavení loriky trvá 5-15 minut. Lorika sestává z vnější vrstvy podélných žeber a vnitřní vrstvy helikálních žeber. Už při exocytóze buňka vylučuje žebra v pořadí, v jakém je bude potřebovat při sestavování loriky (nejprve vnější podélná žebra pak vnitřní helikální).

Stephanoecidae jsou tzv. tectiformní choanoflageláti a zahrnují nejvíce druhů uspořádaných do 28 rodů. Jejich lorika sestává z podélných a příčných žeber, v některých případech i helikálních. U tectiformních

⁶ Obaly choanoflagelátů určují jakým způsobem se buňky choanoflagelátů dělí. Nahé druhy se dělí obyčejným podélným dělením. Druhy s thékou nebo lorikou se takto dělit nemohou. U těchto druhů se buďto mateřská buňka ještě před dělením, nebo jedna z dceřiných buněk po rozdělení přemění v amébu, opouští obal a poté si vytvoří nový. U druhů s lorikou si dceřiná buňka někdy odnáší svazek křemičitých žeber sebou, jindy si je musí postavit celé sama.

druhů buňka usazená v lorice ještě před dělení nashromáždí na zadní straně (uvnitř límce) kompletní sadu žeber. Ta exocytuje opět v přesně daném pořadí, ale opačném než u nudiformních druhů (nejprve vnější podélná a pak vnitřní příčná případně helikální). Po dělení předtím, než opustí buňku, se juvenilní jedinec otočí o 180°, navleče na sebe připravená žebra, takže je má uspořádány ve správném pořadí, a opustí starou loriku. Podobně jako nudiformní druhy si uplete novou pohybem vpřed za současné rotace.

Metazoa (živočichové)

Mnohobuněčné organismy, které si pro mnohobuněčnou existenci vyvinuly typické mezibuněčné spoje, způsoby komunikace buněk a mezibuněčnou hmotu (typická je přítomnost kolagenu). Mají značně pozměněný mitochondriální genom: Malý (16 kbp, 37 genů), zvláštní tRNA a rRNA, odchylky od standardního genetického kódu.

Některé místa ve fylogenezi živočichů jsou stále nevyjasněná a týká se to také pořadí odvětvení linií u kořene stromu metazoi. Prvními větvemi metazoi jsou bez pochyby Radiata (diblastika), ovšem která linie radiat představuje první (bazální) větev na fylogenetickém stromu živočichů dlouho nebylo jasné. Soupeřilo spolu několik hypotéz a každá z nich je podpořena mimo jiné i výsledky fylogenetických analýz založených na desítkách až stovkách genů. Letos se jeví nejpravděpodobnější hypotéza podpořená analýzami více než tisíce genů, že první větev živočichů představují houbovci (Porifera). Další hypotéza předpokládá, že první linií živočichů jsou žebernatci (Ctenophora).

Bilateralia tvoří přirozenou skupinu stejně jako druhoústí (Deuterostomia) a pravděpodobně i prvoústí. V rámci protistologie se budeme zabývat pouze těmi skupinami metazoi, které mají alespoň nějaký vztah k jednobuněčnosti.

Porifera

Asi 5000 druhů spadá do 3 skupin podle materiálu, ze kterého mají tvořený skeleton (vápenaté, křemičité a sponginové). Většinou usedlé a mořské druhy. Je to v podstatě kolonie čtyř typů buněk. Když je rozmixujete, buňky se opět slezou a vytvoří houbu.

- Choanocyty („límečkové buňky“) Jsou ve vnitřní dutině a představují trávicí soustavu houby. Jsou podobné choanoflagelátům.
- Porocyty – trubicovité buňky, které vytváří póry.
- Epidermální buňky – tvoří povrch.
- Amébocyty – jsou mezi choanocyty a epidermis. Přenáší živiny, sekretují skeleton a vytváří gamety.

Porifera se rozmnožují buď pohlavně – produkují spermie do vody (fotka vlevo dole na snímku, vypadá to jako by se z houby prášilo), ty oplodní vajíčko v jiném jedinci a vznikne plovoucí larva, která se usadí. Mohou se však rozmnožovat také nepohlavně (pučením).

Podobnost choanocytů hub a choanoflagelátů vedla k formulování hypotézy, že houby vznikly z kolonií choanoflagelátů, a že by se tedy živočichové odvětvovaly zevnitř choanoflagelátů. Přechná stadia mohla vypadat jako dnešní kolonie choanoflagelátů *Salpingoeca rozeta*. Proti této hypotéze teorii stojí výsledky fylogenetických analýz, které ukazují, že choanoflageláti jsou monofyletickou sesterskou skupinou metazoi – tj. metazoa nejsou vnitřní skupinou choanoflagelátů. Nejpravděpodobnější tedy je,

že předek metazoi a choanoflagelátů byl jednobuněčný (mohl vypadat asi jako choanoflagelát), ale zřejmě byl nějak predisponován k tvorbě mnohobuněčných kolonií až organismů, protože tyto nacházíme u obou skupin.

Myxozoa

Asi 1300 druhů. Tkáňoví a vnitrobuněční paraziti. Mají složité životní cykly zahrnující dva hostitele (1. většinou ryba, 2. většinou kroužkovec nebo mechovka). Produkují dva typy spor – myxosporý vznikají v rybách. Jsou na první pohled podobné mikrosporidiovým sporám a také obsahují, tentokrát dvě a více, vystřelovací vlákna v polárních kapsulách. Tyto spory jsou však mnohobuněčné útvary a vlákna neslouží injikaci sporoplasmu ale k přichycení na tkáň hostitele. V kroužkovci dochází k pohlavnímu procesu, meióze, vzniku gamet, zygoty a nakonec druhého typu spor – aktinosporý – které jsou infekční pro ryby. Sporoplasma migruje do tkáně a jednotlivé buňky penetrují do buněk hostitele. Tam dochází k množení v několika cyklech, pro které je typické, že dceřiné buňky vznikají uvnitř mateřských. Množení je zakončeno tvorbou myxospor.

Myxozoa jsou závažní paraziti ryb s hospodářským významem. Fylogenetické analýzy jasně ukazují, že jsou to metazoa, ale není jasné, kam patří v rámci metazoi. Ve hře jsou dvě hypotézy, z nichž ta druhá je letos věrohodnější:

- 1) Myxozoa jsou skupinou bilaterálií. Silným argumentem pro tuto hypotézu byl poznatek, že mnohobuněčný „červ“ *Buddebrockia plumatellae* – parazit sladkovodních mechovek je podle sekvencí myxozooan. *Buddebrockia* vykazuje dvoustrannou souměrnost. Dalším argumentem pro příbuznost s bilaterálií je skutečnost, že u myxozoi nacházíme některé Hox geny (genů homeoboxu regulujících tvorbu tělních segmentů u živočichů), které jsou typické pro bilateralia.
- 2) Myxozoa jsou příbuzní žahavcům. Pro příbuznost s žahavci svědčí podobná stavba polárních kapsul a nematocyst žahavců a zejména pak fylogenetická analýza založená na více než 100 genech, která ukázala přesvědčivě, že se jedná o vnitřní skupinu žahavců. Bilaterální symetrie buddebrockie je zřejmě konvergence.

Mammalia (savci)

Některé nakažlivé rakoviny jsou de facto jednobuněční parazitictí savci. Známá je pohlavně přenosná rakovina psů (CTVT) a kousáním přenosná rakovina dčablů (DFTD). Obě buněčné linie vznikly chromozomovou přestavbou (mají odlišný karyotyp od normálních buněk) a nyní se přenáší samy fyzickým kontaktem – pohlavním stykem nebo kousáním. Zatímco CTVT není pro psy velmi nebezpečná, DFTD je pro tasvánské dčably vždy smrtelná. První případ DFTD byl dokumentován v roce 1995, počty tasvánských dčablů se výrazně snižují a hrozí vyhynutí.

Studium protistních opisthokont je přínosné pro pochopení evoluce mnohobuněčnosti u metazoi (nepovinné)

Buňky metazoi vykazují mnoho specifických vlastností, které nenacházíme u jiných eukaryot a je možné, že některé z těchto vlastností umožnily evoluci mnohobuněčnosti u metazoi – např. adheze buněk, tvorba extracelulární matrix, nové typy buněčné signalizace. Proto se v posledních letech objevilo mnoho srovnávacích studií, které pátrají v genomech jednobuněčných linií opisthokont, aby zjistili, jestli se geny pro proteiny účastnící se těchto dějů objevili až u metazoi a nebo již dříve u jejich jednobuněčných předků. Často se ukazuje, že se objevili již dříve. Níže uvádím dva příklady podobných studií.

Integriny jsou transmembránové proteiny, které zprostředkovávají spojení mezi buňkou a tkání, která ji obklopuje. Vně buňky se váží na složky extracelulární matrix, jako jsou fibronektin, vitronektin, kolagen a laminin. V cytoplasmě se pak váží na aktinový cytoskelet, interagují s proteiny α -aktinin, talin paxillin a vinkulin. Kromě mechanického spojení přenáší také signály. Integriny byly dosud známy jen z metazoi. Na snímku 48 jsou ukázány výsledky studie, která zjistila, že integriny, společně s ostatními proteiny, které s integriny interagují, jsou přítomny u opisthokonta *Capsaspora owczarzakii*. Integrinový systém se tedy vyvinul již dříve. Překvapivě se geny pro integriny nenašly u choanoflagelátů, kteří představují bližší linii k metazoi než *Capsaspora*. V tomto případě jde zřejmě o druhotnou ztrátu. Všimněte si, že geny pro některé proteiny zprostředkovávající vazbu integrinů a aktinového cytoskeletu se nacházejí také u dalších linií opisthokont a dokonce u amoebozoí. Samotné integriny tam však chybí.

Pod postsynaptickou membránou nervového spoje je na elektronovém mikroskopu nápadná struktura, tzv. „postsynaptic density“. Je to složitá signalizační síť mnoha typů proteinů, která zprostředkovává přenos signálu z neurotransmiteru vyloučeného do synaptického spoje dovnitř buňky neuronu. Nervová tkáň a také tyto proteiny jsou unikátním znakem metazoi. Velká část těchto proteinů (na snímku 49 označeny červeně) byla ovšem nalezena i u choanoflagelátů. Tam rozhodně plní jinou funkci než vnímání signálu z neurotransmiteru. Pravděpodobně zprostředkovává spojení signálů iontové povahy (Ca_2^+) a cytoskeletu.

Jedním z osmi signalizačních systémů, které jsou považovány za specifické pro metazoa je systém P-tyrosin kináz. Ten sestává z tyrosin kináz (TyRK), které připevňují signální značku (kyselinu fosforečnou) na tyrosinový zbytek čouhající z patřičného proteinu. Tyrosin kinázovou aktivitu může mít třeba receptor poté, co se na něj naváže ligand. Druhou složkou tohoto signalizačního systému jsou SH2 domény. Ty specificky rozpoznávají náfosforylovaný tyrosin, vážou se na něj a tak přitáhnou do míst, kde se objevila P-tyrosinová značka proteinu jehož jsou součástí. Tento protein v místě vykoná svou aktivitu (třeba opět něco náfosforyluje) a signál se tak přesunuje dál. Každý správný signál, aby dobře fungoval, musí po nějaké době zmizet. O to se starají tyrosin fosfatázy (PTP). Ukázalo se, že systém P-tyrosin kináz je bohatě rozvinutý již u

choanoflageláta *Monosiga brevis*. Sedm dalších specificky metazoálních signalizačních systémů tam nalezeno nebylo. Počty nalezených TyrK, SH2 a PTP domén v genomu monosigy nejsou o nic nižší než jejich počty v genomech metazoí (viz graf na snímku č. 50 vlevo). Je zajímavé, že tyto domény jsou u předpokládaného proteomu monosigy součástí poměrně dost odlišného spektra proteinů, než v jakých se nachází u metazoí (překryv je asi jen 30 %). *Monosiga* je zřejmě využívá v jiných signálních drahách.

OBAZOA

Následující dvě neopisthokontní skupiny, jsou opisthokontům s velkou pravděpodobností příbuzné a společně tvoří skupinu Obazoa.

Apusomonadida

Pět rodů – *Apusomonas*, *Multimonas*, *Thecamonas*, *Podomonas* a *Manchomonas* (poslední čtyři byly do loňského roku řazeny do rodu *Amastigomonas*). Biflageláti s thékou na hřbetní straně. Mají tubulární mitochondriální krysty a chromatin v jádře je kondenzovaný podobně jako u dinoflagelátů. *Apusomonas* je dorzoventrálně zploštělý (8-14 mikrometrů). Přední bičík prochází jakýmsi rukávem – mastigoforem – který se může ohýbat a vychází z hloubky buňky. Jsou běžní v půdě a ve sladkých vodách. Vyschnutí přežijí ve formě cyst. U dalších rodů je různou měrou vyvinutý mastigofor. Dva bičíky vycházející subapikálně (těsně pod špičkou buňky) mohou být různě dlouhé (přední bičík je někdy velmi krátký). Na dorzální straně buňky je organická théka, na ventrální straně se vytváří panožky, pomocí kterých fagocytují potravu. Do těchto rodů spadají převážně mořské ale i některé sladkovodní druhy.

Breviatea

Do této skupiny spadají zatím jen několik popsaných druhů *Breviata anathema*, *Subulatomonas tetraspora*, *Pygsiua biforma* a *Lenisia limosa*. Tyto organizmy nápadně připomínají mastigamoebie z říše Amoebozoa. *Breviata* je dokonce ve starší literatuře (před rokem 2006) nazývána *Mastigamoeba invertens*. Stejně jako mastigamoebie žijí v anaerobním prostředí, mají jeden nebo dva bičíky a tvoří pseudopodie. Na rozdíl od mastigameb však mají vždy dvě bazální tělíska. Jejich buňka má diferencováno břišní a hřbetní stranu a panožky tvoří převážně na břišní straně. Má jednu mitochondrii bez kryst (nebo s málo patrnými krystami), zřejmě v důsledku anaerobního nebo mikroaerofilního způsobu života. Jejich postavení je nejasné. Multigenové analýzy ukázaly, že možná sedí na bázi amoebozoí.

Eukaryota *incertae sedis*

Incertae sedis = [z latiny] s nejistým postavením

Eukaryota *incertae sedis* jsou taková eukaryota, u kterých si nejsme jisti, jaká je jejich pozice ve fylogenetickém stromu a klasifikaci eukaryot. Nevíme dokonce ani, do které z říší je máme zařadit. To může mít dvě příčiny: 1) máme málo informací, protože se morfologicky ničemu nepodobají a nemáme žádná molekulární data, 2) molekulární data máme, ale stejně se nepodařilo určit, do které říše tyto organizmy spadají, protože jsou tato data zaplevelena artefakty (přitahování dlouhých větví, laterální genový transfer) nebo protože tato skupina skutečně do žádné říše nepatří a tvoří samostatnou linii eukaryot.

Následující tři linie *Incertae sedis* vytváří pravděpodobně klád pracovně nazvaný podle jejich počátečních písmen **CRuMs**

Collodictyonida

Skupina sestává ze tří rodů bičíkovců – *Diphylleia*, *Collodictyon* a *Sulcomonas*. Jedná se o heterotrofní bičíkovce živící se fagocytózou skrze cytotom, který na první pohled připomíná cytotom exkavát, ale

zřejmě s ním není homologický. *Diphylleia* má dva bičíky a žije v moři, *Collodictyon* čtyři bičíky a žije ve sladkých vodách a *Sulcomonas* má dva bičíky a byl nalezen ve střevě ropuchy. Známe sekvenci malé ribozomální podjednotky, která však nepomohla jejich postavení vyřešit. Zatím nepublikovaná studie analyzovala fylogenetické postavení rodu *Collodictyon* na základě sekvencí desítek proteinů, ale ani to nepomohlo vyřešit jejich postavení na eukaryotickém stromu. Jedná se zřejmě o hluboce se větvící linii na bázi opisthokont a amoebozoí.

Rigifilida

Opět amébovité organizmy nacházené v sladkovodních sedimentech. Známé jsou dva druhy *Micronuclearia podoventralis* a *Rigifila ramosa*. Svým tvarem připomínají kryténky (arcelinida). Na rozdíl od krytének nevytváří extracelulární schránku, ale je vyztužují dorzální stranu buňky proteinovou vrstvou a mikrotubuly, což jí propůjčuje hříbovitý vzhled. Na ventrální straně buňky z jednoho místa vysouvají panožky.

Mantamonadida

Mořští dorzoventrálně zploštělí bičíkovci pohybující se pomocí „glidingu“ (lezení) na dlouhém zpětném bičíku. Buňka má nepravidelný tvar a při pohledu shora připomíná rejnoka *Manta* (odtud jméno). Přední bičík je velmi tenký a špatně viditelný. Živí se bakteriemi, které pohlcuje pomocí pseudopodií.

Další eukaryota *incertae sedis*

Ancyromonadida (některými autory používají název Planomonadida)

Jeden rod (7 popsaných druhů) heterotrofních mořských bičíkovců se dvěma bičíky, přední bičík je často velmi krátký. V místě, kde bičíky odcházejí z buňky, mají extruzómy (hrbolky) pro lov kořisti. Zde také fagocytyjí. Jsou nápadně dorzoventrálně zploštělí. Na hřbetní straně mají krunýř – théku – tvořenou tenkou (pravděpodobně proteinovou) vrstvou pod cytoplasmatickou membránou. Typicky se pohybují po substrátech pomocí klouzáním po bičíku (gliding), ve vodním sloupci se pohybují se houpavým pohybem (wobling). Mají ploché mitochondriální kristy. Mořští i sladkovodní (jezero Bajkal) zástupci.

Cavalier-Smith nedávno postuloval **hypotézu Sulcozoa**, podle které tvoří výše zmíněné skupiny *incertae sedis* (ancyromonády, mantamonády, apusomonády, breviatea, rigifilida a collodictyonidi) taxon na bázi opisthokont a amoebozoí. Cavalier-Smith si totiž všiml několika společných znaků této skupiny, které jsou více či méně přítomny u všech (1) diference břišní a hřbetní strany buňky s tím, že hřbetní je vyztužena, (2) tvorba panožek z více či méně vyvinuté rýhy na břišní straně a také (3) poměrně vzdálené podobnosti v uspořádání cytoskeletu. Postulovaný taxon Sulcozoa (*sulcus*=žlab) nemusí nutně představovat přirozenou (monofyletickou) skupinu ale spíše vývojový stupeň. Některé skupiny (apusomonády a breviáti) budou příbuzné spíše opisthokontům, jiné spíše amoebozoím a další (collodictyonidi) mohou sedět na společné větvi amoebozoí a opisthokont. Cavalier-Smith postuluje, že předek této skupiny měl břišní rýhu odvozenou od exkavátní břišní rýhy, ve které vytvářel panožky, jimiž fagocytoval potravu. Jednalo se o přisedlý organizmus pohybující se po površích pomocí lezení (gliding) na zadním bičíku. Budoucnost ukáže, jestli se tento nápad Cavaliera-Smithe potvrdí.

Zcela nejasné je postavení skupiny **Spironemida (Hemimastigophora)**. Ta sestává ze čtyř rodů (u prvních tří byla udělána elektronmikroskopická studie) – *Spironema* (na obr. a), *Hemimastix* (d), *Stereonema* (c), *Paramastix* (b). Buňka je dorzoventrálně zploštělá a krytá pevnou kutikulou (kortikálními pláty)

podpořenými mikrotubuly. Bičíky vystupují v místech mezi pláty. Živí se fagocytózou v přední části buňky. Buňky se pohybují volně nebo přisedají na substrát pomocí tenké stopky a pozorován byl i metabolický (euglenoidní) pohyb. Žijí v půdě, ve sladkých vodách i v moři. Zatím nalezeny jen na jižní polokouli. Fylogenetická analýza založená na velkém množství genů ukázala, že se jedná o samostatnou hlubokou linii eukaryot.

Čistým příkladem prvního typu *incertae sedis* (tedy zcela bez informací) je ***Meteora sporadica***. Zvláštní amébovitý organizmus izolovaný ze dna Středoziemního moře. Nemá bičíky, ale má čtyři zvláštní výrůstky. Těmi kratšími (s boulemi) kývá, a tak se plazí substrátem na dně. Pravděpodobně se živí bakteriemi. Nemáme od ní žádná sekvenční data a zatím nebyla publikována ani elektronmikroskopická studie. K všeobecnému překvapení se kanadské laboratoři podařilo, 30 let po prvním a jediném pozorování, organismus ulovit a kultivovat (viz. video přiložené k přednášce). Sekvenční data ukazují, že se jedná o další hlubokou linii, ale studie zatím nebyla publikována.