

LESZEK KUŹNICKI

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: kuznicki@nencki.gov.pl

EWOLUCJA PIERWOTNIAKÓW — WIĘCEJ PYTAŃ NIŻ ODPOWIEDZI

W 1993 r. z Patricią L. Walne opublikowaliśmy artykuł pt. „Protistan Evolution and Phylogeny: Current Controversion” (KUŹNICKI i WALNE 1993). W ciągu 7 lat, które od tego czasu upłynęły literatura dotycząca przedmiotu ogromnie się wzbogaciła. Wiele cząstkowych spraw zostało poznanych, ale przyrost wiedzy nie wyjaśnił podstawowych problemów dotyczących przebiegu ewolucji na poziomie

jednokomórkowych organizmów eukariotycznych.

Przed wszystkim, bez jakiegokolwiek jednoznacznej odpowiedzi pozostaje kwestia — kiedy pojawiły się pierwsze jednokomórkowe Eukaryota (pierwotniaki). W niniejszym artykule określenie „pierwotniaki” będę stosował jako równoważne do „Protista”, „Protoktista” lub „jednokomórkowe Eukaryota”.

KIEDY WYKSZTAŁCIŁY SIĘ PIERWSZE JEDNOKOMÓRKOWE EUKARYOTA?

Przez lata utrzymywało się przekonanie o długiej ewolucji prokariotów (ponad 3,5 mld lat) i późnym powstaniu eukariotów (ok. 1 mld lat). Ten punkt widzenia został podważony jednocześnie z kilku stron i to na podstawie informacji z niezależnych obszarów badań. Według KNOLLA (1992), geologiczna perspektywa pozwala przypuszczać, że Eukaryota istniały już 1.9 mld lat temu, ale z pewnością pojawiły się nie później niż przed 1,7 mld lat. Z tego okresu znane są sferomorficzne akrytraki (*Acritarcha*) o średnicy od 40 μm do 240 μm . W tym samym roku co publikacja Knolla, ukazała się również w „Science” praca HANA i RUNNEGARA (1992), którzy odkryli setki osobników przypominających fotosyntetyzujący glon *Grypania spiralis*. Jest to dobrze znany z młodszych osadów gatunek kopalny, o strukturze wstęgi o szerokości 2 mm i długości dochodzącej do 500 mm. Nie ulega wątpliwości, że Han i Runnegar natrafili na ślad po wielokomórkowym, zaawansowanym ewolucyjnie, organizmie eukariotycznym. W konsekwencji autorzy uważają, że proces eukariogenezy musiał mieć miejsce około 2,7 mld lat temu.

Starsze ślady życia liczące do 3,5 mld lat sugerują możliwość występowania już wtedy pierwotnego ekosystemu (SCHOPF 1992). Nie ma

jednak obecnie żadnych możliwości rozstrzygnięcia, czy był to ekosystem złożony z Prokaryota, czy też jego elementem były również prymitywne Eukaryota. Najmniejsze, znane wspólnie Eukaryota. Najmniejsze, znane wspólnie, komórki eukariotyczne mają 3,5 μm średnicy. Ślady organizmów o takich średnicach występują już w najstarszych pokładach osadowych, co jednak nie może stanowić jednoznacznego dowodu. Badania filogenezy oparte o porównawcze studia rRNA z małych i dużych podjednostek rybosomów nie dają podstaw do datowania, ale pośrednio przemawiają za długą ewolucją Eukaryotów. Ten punkt widzenia reprezentują KUŹNICKI (1989) i SOGIN (1991). Można założyć, że pojawienie się prymitywnych eukariotów jako odrębnej gałęzi rozwojowej — kladu miało miejsce nie później niż 3,5 mld lat temu. W istocie, jeśli analizować krytycznie ślady organizmów zachowane w rogowcach formacji żelazonośnej Gunflint (Kanada) oraz szczątki znalezione w innych osadach litoralnych o wieku 3,4–3,5 mld lat, trudno jest ustalić, czy te zróżnicowane wielkościowo formy są odciskami tylko prymitywnych prokariotów, czy też bakterii i prymitywnych pierwotniaków. Brak w atmosferze tlenu (czy też bardzo niski jego poziom) oraz osłony ozonowej, mógł raczej stwarzać warunki korzystne dla pierwot-

nych eukariotów, a nie uniemożliwiający ich powstanie.

Źródłem energii wszystkich gatunków zaliczanych do taksonu Archezoa jest anaerobowa glikoliza. Co więcej — niektóre współczesne mitochondrialne gatunki należące do taksonu Protozoa, to anaeroby fakultatywne. W warunkach beztlenowych organizmy te uzyskują energię wskutek fermentacji. Kiedy tlen staje

się dostępny utleniają one produkty fermentacji aż do wody i tlenu. Nie ma podstaw twierdzenia, że eukarioty nie mogły się pojawić na Ziemi dopóki nie nastąpił dostateczny wzrost stężenia tlenu atmosferycznego. Mamy natomiast więcej powodów, aby uznać za bardziej prawdopodobną tezę o długiej (3,5 mld lat) niż krótkiej (1 mld) ewolucji jednokomórkowych eukariotów.

CZY ARCHEZOA SĄ PRZEDSTAWICIELAMI NAJSTARSZYCH EUKARIOTÓW?

CAVALIER-SMITH (1983) ustanowił takson Archezoa o randze królestwa, włączając doń 4 typy: Archamoebae, Metamonada, Microspora i Parabasala. Gatunki należące do Archezoa charakteryzuje brak mitochondriów, plastydów, typowego aparatu Golgiego, hydrogenosomów oraz peroksyosomów, a ich rybosomy i rRNA wykazują podobieństwo do odpowiednich struktur prokariotów. W większości są to symbionty lub pasożyty różnych gospodarzy, tylko typ Archamoebae składa się wyłącznie z pierwotniaków wolnożyjących. W założeniu, Archezoa, jako gatunki amitochondrialne, miały reprezentować najstarsze i najbardziej prymitywne Eukaryota. Kiedy ostatnio okazało się, że Microspora są prymitywnymi, silnie uproszczonymi grzybami, Cavalier-Smith włączył Archezoa jako podkrólestwo obejmujące już tylko taksony Archamoebae i Metamonada do królestwa Protozoa.

Wielokrotnie wyrażano opinię, że wszystkie gatunki Archezoa mają uproszczoną budowę i pewne podobieństwa do Prokaryota w konsekwencji długiego okresu symbiozy lub pasożytnictwa. W celu obrony swego stanowiska CAVALIER-SMITH i CHAO (1996) dokonali sekwencjonowania SSUrDNA u wolnożyjącego diplomonada *Trepomons* i wykazali duże jego podobieństwo do *Giardia* czy innych gatunków Metamonada występujących u ssaków i u owadów.

Nowa filogenetyka pierwotniaków, oparta na porównawczej analizie sekwencji genów, stwarza nadzieję na zbudowanie klasyfikacji wynikającej z rzeczywistego pokrewieństwa. Co więcej, należy mieć nadzieję, że na tej drodze uda się odtworzyć przebieg ewolucji komórki eukariotycznej, poznać współzależności między jądrem a organellami cytoplazmatycznymi, jak również wyjaśnić naturę i mechanizmy pasożytnictwa. Dotychczas jednak metoda ta jest pełna pułapek i stwarza wiele zamętu.

Na przykład, drzewa filogenetyczne odtwarzane na podstawie analizy porównawczej struktury rRNA nie dają się w żaden sposób pogodzić z drzewami filogenetycznymi budowanymi

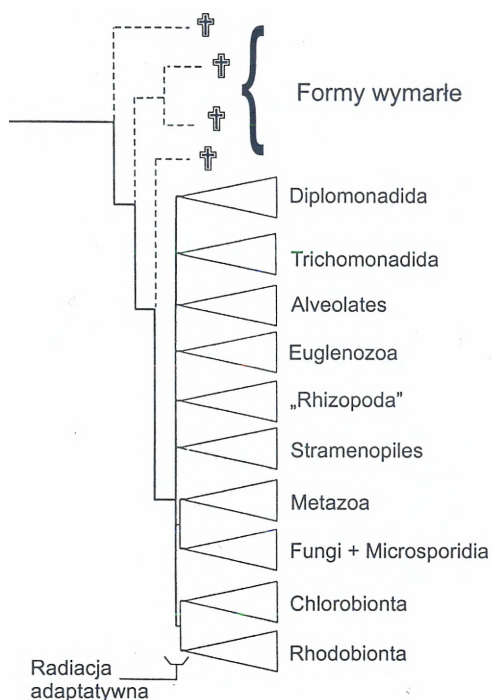
w oparciu o podobne analizy „podstawowych” białek eukariotów, jakimi są aktyna i β -tubulina.

PHILIPPE i ADOUTTE (1998), dążąc do zmniejszenia ilości pomyłek i jednostronnych wniosków towarzyszących szkicowaniu drzew filogenetycznych, szczegółowo porównywali zmiany genów kodujących białka, aktynę i β -tubulinę, z genami rRNA u tych samych taksonów. Na tej podstawie autorzy doszli do wniosku, że większość, jeśli nie wszystkie, monofiletycznych taksonów eukariotów, powstała w wyniku jednoczesnej, rozległej radiacji adaptatywnej (Ryc. 1). Mitochondrialna endosymbioza miała miejsce tuż przed tą radiacją. Mikrosporidia i metamonady wtórnie utraciły mitochondria i nie ma podstaw do uznawania ich za pierwotne formy eukariotów.

W celu wyjaśnienia zjawiska ekspansji eukariotów PHILIPPE i ADOUTTE (1998) powrócili do koncepcji ewolucji kwantowej proponowanej przez SIMPSONA (1944), a rozwiniętej współcześnie przez GOULDA (1989). Całe zróżnicowanie eukariotów zaszło prawdopodobnie we względnie krótkim czasie. PHILIPPE i ADOUTTE (1998) bynajmniej nie twierdzą, że postulowany przez nich „wielki wybuch” — „big-bang”, oznaczał początek ewolucji eukariotów. Przeciwnie, uważają, że poprzedzał go długi okres ewolucji na poziomie komórkowym. Ogromna większość, a może nawet wszystkie prymitywne Eukaryota bądź wymarły, bądź uległy gruntownym przekształceniom w trakcie „wielkiego wybuchu”. Wybuchowa radiacja adaptatywna zaszła w niedającym się ściśle zidentyfikować okresie — od 1000 do 700 mln lat temu.

Datowanie to jest umowne, ale można je umiejscowić i powiązać z istotnymi wydarzeniami geologicznymi. Mamy mocne dowody na istnienie przynajmniej od 1100 mln lat superkontynentu nazwanego Rodinia. Przed 750 mln lat Rodinia rozdzieliła się. Między częściami, z których jedno przesunęło się na północ a drugie na południe, powstał wielki ocean. Około 600 mln lat temu kontynenty ponownie się połączyły

tworząc kolejny superkontynent — Pannotię. Bogata w dobrze zachowany materiał paleontologiczny era paleozoiczna rozpoczęła się przed 570 mln laty.



Ryc. 1. Schemat ilustrujący hipotezę „big-bang” PHILIPPE’A i ADUTTE’A (1998) dotyczącą ewolucji eukariotów.

Pierwotne, prawdopodobnie anaerobowe Eukaryota wymarły bezpotomnie, bądź w następstwie endosymbiozy pozyskały mitochondria i przeszły radiację adaptatywną. Wśród 10 monofiletycznych grup, które wówczas powstały tylko między Animalia (Metazoa) i Fungi oraz w obrębie Plantae między Chlorobionta i Rhodobionta można wykazać istnienie związków filogenetycznych.

PHILIPPE i ADOUTTE (1998) nie wiążą swoich przypuszczeń dotyczących „eukariotycznego big-bangu” z wydarzeniami geologicznymi. Wzmiankę o nich uznałem jednak za konieczną dla uświadomienia jakie makrozjawiska w tym przedziale czasu zachodziły na Ziemi.

Utworzenie taksonu Archezoa z amitochondrialnych pierwotniaków można uznać za uza-

sadnione porządkiem wiedzy biologicznej. CORLISS (1994) i KUŹNICKI (1996) nie mieli złudzeń, że jest to takson parafiletyczny czy wręcz polifiletyczny. Obecnie, kiedy z wysokim prawdopodobieństwem powinniśmy zaliczyć mikrospory do grzybów (a więc względnie młodych ewolucyjnie gatunków), ich największy, wśród wszystkich żyjących obecnie eukariotów, prymitywizm, okazał się wtórny. Skoro mikrospory nie są żywymi skamielinami trudno uzasadnić, że są nimi wiciowce zaliczane do Metamonada. Większość z nich, jak na przykład najlepiej znany rodzaj *Giardia* są jelitowymi symbiontami ssaków i owadów. Brak mitochondriów i innych wewnątrzkomórkowych organelli jest z dużym prawdopodobieństwem wtórny, związany z anaerobowym środowiskiem.

Wśród Metamonada znajdują się jednak wiciowce wolnożyjące i również wolnożyjące są wszystkie gatunki zaliczane do typu Archamoebae. Czy w takim razie tylko one są żywymi skamielinami wśród eukariotów? Takie przypuszczenie jest również wątpliwe, gdyż wszystkie wolnożyjące gatunki Archezoa zamieszkują środowiska ubogie w tlen. Ich amitochondrialność i inne znaczne uproszczenia mogą być wywołane długotrwałym, jednokierunkowo działającym doбором naturalnym.

Czy można więc z całą pewnością wykluczyć obecność wśród współcześnie żyjących pierwotniaków prymitywnych pierwotnie amitochondrialnych form? Nie, gdyż nasza wiedza jest nadal krańcowo fragmentaryczna. CANNING (1998) w *addendum* do swojego artykułu poświęconego powiązaniom ewolucyjnym Microsporidia stwierdziła: „mamy silny dowód potwierdzający tezę, że mikrosporidia nie są pierwotnie amitochondrialne, ale ich związki z grzybami wymagają nadal wyjaśnień”.

Na obecnym etapie poznania pierwotniaków wydaje się pewniejsze uznanie gatunków zaliczanych do Archezoa za wtórnie zredukowane formy niż za rzeczywistych przedstawicieli prymitywnych eukariotów. Uproszczona budowa komórki i specyficzny metabolizm anaerobowych protistów (MÜLLER 1998) pozwala nam jednak snuć przypuszczenia na temat pierwotnych dróg ewolucji komórki.

CZY PROTOZOA BYŁY TYGLEM DLA KOLEJNEJ RADIACJI ADAPTATYWNEJ EUKARIOTÓW?

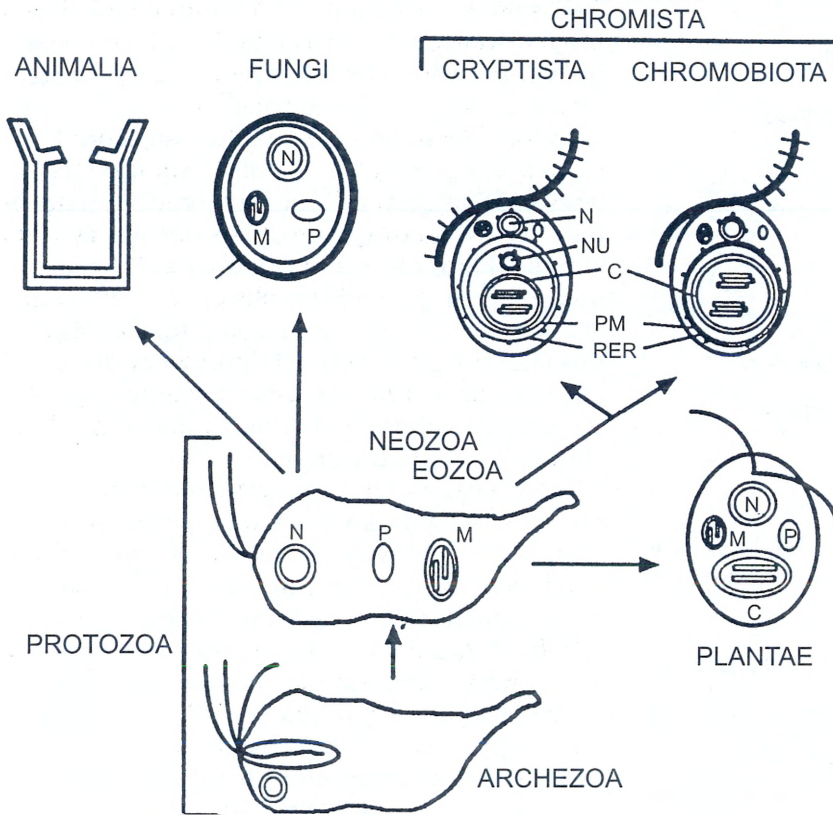
Wśród licznych współczesnych hipotez dotyczących ewolucji eukariotów należy przede wszystkim rozważać dwie: big-bang (PHILIPPE i ADOUTTE’A 1998) i stopniową ewolucję. W myśl tej ostatniej najpierw miała miejsce radiacja Archezoa, której przejawem jest wielkie różni-

cowanie jednokomórkowych eukariotów zaliczanych do królestwa Protozoa, a następnie pewne gatunki pierwotniaków dały początek radiacjom, w wyniku których wykształciły się chromisty, rośliny, grzyby i zwierzęta (Ryc. 2).

Big-bang eukariotów (PHILIPPE i ADOUTTE 1998) miał być następstwem symbiozy mitochondrialnej i być może nabyciem przez niektóre formy zdolności do fagotrofii. Wcześniejsze anaerobowe gatunki, z których wykształciły się współczesne Eukaryota, nie dotrwały do

pami monofiletycznymi, klasyfikowanymi jako królestwo Protozoa, nie można wykazać żadnych relacji filogenetycznych. To samo dotyczy związków pomiędzy Chromista (Stramenopiles) a pozostałymi 9 liniami monofiletycznymi. Jedynie Animalia (Metazoa) i Fungi oraz Rhodo-

CESARSTWO EUKARYOTA



Ryc. 2. Związki ewolucyjne między królestwami w obrębie cesarstwa Eukaryota wg CAVALIER-SMITH'A (1998).

Oznaczenia: N — jądro, M — mitochondrium, P — peroksyosom, C — chloroplast, RER — siateczka śródplazmatyczna, PM — błona peryplastydowa, NU — nukleomorf, CW — ściana chitynowa. Rycina częściowo zmieniona.

współczesnych czasów (Ryc. 1). „Unowocześnienie” komórki eukariotycznej połączone z rozległą radiacją adaptatywną, które miało zajść w krótkim odcinku czasu, oznaczało przekształcenie nielicznych form, a także nagłe wymarcie większości gatunków Archezoa.

PHILIPPE i ADOUTTE (1998) wyróżnili 10 monofiletycznych grup: Diplomonadida, Trichomonadida, Alveolates, Euglenozoa, „Rhizopoda”, Stramenopiles, Metazoa, Fungi+Microsporidia, Chlorobionta, Rhodobionta (Ryc. 1). Wśród tej dziesiątki pierwsza połowa to odpowiedniki taksonów różnej rangi tworzące królestwo Protozoa. Pozostałe 5 grup monofiletycznych odpowiada czterem królestwom przyrody (Chromista, Animalia, Fungi, Plantae). W ocenie PHILIPPE'A i ADOUTTE'A (1998) między 5 gru-

bionta i Chlorobionta (tworzące królestwo Plantae) wykazują oznaki wspólnego pochodzenia.

Sumując, hipoteza big-bangu eukariotów całkowicie wyklucza rolę gatunków zaliczanych do Protozoa w ewolucji prowadzącej do powstania zwierząt, grzybów, roślin i chromistów.

Zwolennicy ewolucji stopniowej, na przykład CAVALIER-SMITH (1998), za tygiel dalszych przemian ewolucyjnych uważają królestwo Protozoa (Ryc. 2). W nim szczególna rola przypadłaby dwuwiciowym wiciowcom, należącym do taksonu Neozoa. Po zróżnicowaniu, które zaszło na poziomie komórkowym, dalsze procesy powstawania organizmów wielokomórkowych (tkankowych): zwierząt, grzybów i roślin, przebiegały już w sposób całkowicie wzajemnie niezależny. Powstaje pytanie, czy przy współczesnym

stanie nauki można rozstrzygnąć w jaki sposób zachodziła radiacja adaptatywna eukariotów na poziomie komórkowym? Odpowiedź może być tylko negatywna.

Przede wszystkim brak jest jakichkolwiek dowodów z zakresu paleontologii, kiedy i na jakiej drodze zachodziło „unowocześnienie” pierwotniaków. Inną komplikacją są zjawiska wielokrotnego pojawiania się i zaniku istotnych organelli komórkowych w toku procesów ewolucyjnych. Mitochondria i chloroplasty nabyte drogą endosymbiozy u niektórych gatunków zostały przez dobór naturalny wyeliminowane. Endosymbiontami pierwotniaków były zarówno Prokaryota, jak i Eukaryota. Chloroplasty były nabywane wtórnie i tracone ponownie, jak to miało miejsce w toku ewolucji gatunków zaliczanych do Chromista i Dinoflagellata. Wić, podstawowy i pierwotny czynnik napędowy komórki, podczas ewolucji eukariotów wszystkich królestw była gubiona nieodwracalnie, (u grzybów) lub gubiona i odtwarzana. O skali przekształceń strukturalnych i ultrastrukturalnych świadczą rewolucyjne zmiany przynależności taksonomicznej niektórych typów. Myxozoa zostały ostatecznie przeniesione z królestwa Pro-

tozoa do Animalia, a uznawane za najprymitywniejsze pierwotniaki — Microspora — do królestwa Fungi.

Procesy zaniku i pojawiania się organelli możemy analizować na podstawie badań porównawczych gatunków klasyfikowanych jako należące do królestwa Protozoa. Jest to królestwo, na tle wszystkich pozostałych, najbardziej zróżnicowane jeśli chodzi o formy przystosowań jakie w toku ewolucji zachodziły na poziomie komórki eukariotycznej. W istocie, takson ten jest nie tylko parafiletyczny, lecz wręcz polifiletyczny. Nawet jeśli przychylimy się do koncepcji wielkiego wybuchu jako sposobu radiacji adaptatywnej eukariotów, wnioski poznawcze płynące z badania Protozoa są istotne. Na zasadzie analogii pozwalają one tworzyć modele dróg przekształceń, które leżały u genezy powstania zwierząt, grzybów, roślin i chromistów. Z drugiej strony, big-bang eukariotów to hipoteza, której zgodnie ze współczesnym stanem nauki, nie można ani udowodnić ani obalić. W tej sytuacji rozważania dotyczące ewolucji stopniowej i przypuszczalnych związków filogenetycznych między pierwotniakami a pozostałymi Eukaryotami wydają się nadal godnymi uwagi.

CZY PARAFILETYZM JEST ZJAWISKIEM POWSZECHNYM WŚRÓD WSZYSTKICH KRÓLESTW EUKARYOTA?

Przez lata relacje filogenetyczne odtwarzano w oparciu o morfologię. W miarę rozwoju mikroskopii i poznawania organelli komórkowych, początkowe wnioski okazywały się często wręcz mylące. Z pozoru najprostszy podział eukariotów na mitochondrialne i amitochondrialne, okazał się zawodny.

Większość współczesnych wniosków dotyczących filogenezy eukariotów oparta jest na porównawczych badaniach sekwencji genu (SSUrDNA) z małej podjednostki (18S) rybosomalnego RNA. Uzyskiwane na tej podstawie drzewa filogenetyczne nie pokrywają się z drzewami zbudowanymi na podstawie badań aktywny czy β -tubuliny. Mimo przelomu, jaki na polu relacji ewolucyjnych przyniosła filogenetyka molekularna, można oczekiwać jeszcze wielu niespodzianek. Jedną z nich okazała się przynależność taksonomiczna Myxozoa.

Myxozoa, od ponad stu lat opisywane jako pierwotniaki, były prawdziwym utrapieniem dla taksonomów. Wszystkie znane gatunki w liczbie około 1200 to wewnątrzkomórkowe (o mikronowych wymiarach) pasożyty kręgowców i bezkręgowców, głównie oligochetów. W połowie lat 90. na podstawie molekularnej filogenetyki wykazano, że Myxozoa to krańcowo zredukowa-

ne zwierzęta (ANDERSON 1998). Wspólną cechą gatunków zaliczanych do Animalia jest występowanie kolagenu spajającego dwie różne warstwy epitelium. Okazało się, że stwierdzenie istnienia takiej cechy może być krańcowo trudne.

Dotychczas sądzono, że Animalia wśród wszystkich królestw eukariotów mają najpewniejszy status taksonu monofiletycznego. Zaliczenie Myxozoa do zwierząt otwiera pole do dyskusji.

Królestwo Fungi obejmuje także organizmy jednokomórkowe, jakkolwiek większość to wielokomórkowce. Filogenetycznie wszystkie grzyby są bliskie zwierzętom i prawdopodobnie miały wspólnego przodka. Znacznie bardziej odległe od królestwa Animalia i Fungi są królestwa Plantae i Chromista.

CAVALIER-SMITH (1998) wysunął hipotezę, że wspólnym przodkiem zwierząt i grzybów są wiciowce, których współcześnie żyjący przedstawiciele należą do Choanozoa. Wiciowce te są strukturalnie podobne do troficznych komórek gąbek. Wśród Choanozoa są również gatunki otoczone ścianami. Grupa ta — Corallochytra — w przeszłości była zaliczana do grzybów. Królestwo Fungi, podobnie jak Animalia, wyda-

je się być raczej monofiletyczne, ale włączenie doń typu *Microspora* zaliczanego dotychczas do Archezoa, obraz ten nieco komplikuje.

Według CAVALIER-Smitha (1998) wszystkie cztery królestwa eukariotów (*Animalia*, *Fungi*, *Plantae*, *Chromista*) ewoluowały z różnych gatunków pierwotniaków (Ryc. 2), które autor tej koncepcji umieścił w podkrólestwie Neozoa. Dwuwiciowce Neozoa, w których cytoplazmie cyjanobakterie przekształciły się w chloroplasty zapoczątkowały ewolucję roślin, natomiast Neozoa, w których endosymbiontami były czerwone glony dały początek chromistom. CAVALIER-SMITH (1998) nie był jednak w stanie wskazać przypuszczalnych przodków, z których rozwinęły się gatunki tworzące królestwo *Chromista* i *Plantae*.

U chromistów chloroplast znajduje się w obrębie siateczki śródplazmatycznej. W toku

ich ewolucji chloroplast wielokrotnie zanikał i pojawiał się. Z uwagi na powtarzalne procesy endosymbiozy przeniesienie genów z jąder endosymbiontów do jąder gospodarzy czyni z królestw: *Plantae* i *Chromista*, taksony w istocie parafyletyczne.

W 1998 r. ukazała się obszerna monografia „Evolutionary Relationship Among Protozoa” (COOMBS i współaut. 1998), w której 42 autorów zmagają się z wielce zawikłanym i słabo jeszcze poznanym problemem ewolucji eukariotów na poziomie komórkowym. Problem jest w istocie pasjonujący, ale nadal wyjątkowo kontrowersyjny. Z tego względu w moim artykule ograniczam się do pokazania głównych idei i punktów spornych, ale bez omawiania szczegółów. Zainteresowanych kieruję do wspomnianej uprzednio monografii.

PROTISTAN EVOLUTION — MORE QUESTIONS THAN ANSWERS

Summary

The period of the origin of unicellular eukaryotes is difficult to establish. The author suggest that primitive protists might have been in existence 3.5 billions years ago. There is now good evidence for secondary loss of mitochondria by all amitochondrial protistan species. The hypothesis

of rapid radiation of all Eukaryota branches — „a big-bang” evolution — versus continuous evolution is discussed. Evolution of the eukaryotic cell remains an enigma and challenge to our understanding which should stimulate further studies on protozoan phylogenetics.

LITERATURA

- ANDERSON C. L., 1998. *Phylogenetic relationship of the Myxozoa*. [W:] *Evolutionary Relationship Among Protozoa*. COOMBS G. H. et al. (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 341–350.
- CANNING E. U., 1998. *Evolutinary relationships o Microsporidia*. [W:] *Evolutionary Relationship Among Protozoa*. COOMBS G. H. et al. (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 77–90.
- CAVALIER-SMITH T., 1983. *A 6-kingdom classification and a unified phylogeny*. [W:] *Endocytobiology*. SCHENK H. E. A., SCHWEMMLER W., (red.). Walter de Gruyter, Berlin, str. 1027–1034.
- CAVALIER-SMITH T., 1998. *Neomonada and the origin of animals and fungi*. [W:] *Evolutionary Relationship Among Protozoa*. COOMBS G. H. et al. (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 375–408.
- CAVALIER-SMITH T., CHAO E. E., 1996. *Molecular phylogeny of the free-living archezoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote*. *Journal of Molecular Evolution* 43, 551–562.
- COOMBS G. H., VICKERMAN K., SLEIGH M. A., WARREN A., 1998. *Evolutionary Relationship Among Protozoa*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- CORLISS J. O., 1994. *An interim utilitarian („user friendly”) hierarchical classification and characterisation of the protists*. *Acta Protozool.*, 33, 1–51.
- GOULD S. J., 1989. *Wonderful Life: the Burgess Shale and the Nature of History*. Norton, New York.
- HAN T.-M., RUNNEGAR B., 1992. *Megascopic Eukaryotic Algae from the 2.1-Billion-Year-Old Negaunee Iron-Formation, Michigan*. *Science* 257, 232–235.
- KNOLL A. H., 1992. *The early evolution of eukaryotes: a geological perspective*. *Science* 256, 622–627.
- KUŹNICKI L., 1989. *Wczesna ewolucja komórek eukariotycznych — fakty i hipotezy*. *Postępy Biologii Komórki* 16, 323–344.
- KUŹNICKI L., 1996. *Problem eukariogenezy w świetle badań nad ewolucją i filogenezą pierwotniaków*. *Studia Philosophiae Christianae ATK* 32, 55–72.
- KUŹNICKI L., WALNE P. L., 1993. *Protistan evolution and phylogeny: Current Controversies*. *Acta Protozool.* 32, 135–140.
- MÜLLER M., 1998. *Phylogenetics of Protozoa tubulin with reference to the amitochondriate eukaryotes*. [W:] *Evolutionary Relationship Among Protozoa*. COOMBS G. H. et al., (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 109–132.
- PHILIPPE H., ADOUTTE A., 1998. *The molecular phylogeny o Eukaryota solid facts and uncertainties*. [W:] *Evolutionary Relationship Among Protozoa*. COOMBS G. H. et al., (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, str. 25–56.
- SCHOPF J. W., 1992. *Major Events in the History of Life*. Jones and Barlett, Boston.
- SIMPSON G. G., 1944. *Tempo and Mode of Evolution*. Columbia University Press, New York.
- SOGIN M.L., 1991. *Early evolution and the origin o eukaryotes*. *Curr. Opin. Gerent. Develop.* 1, 457–463.