

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

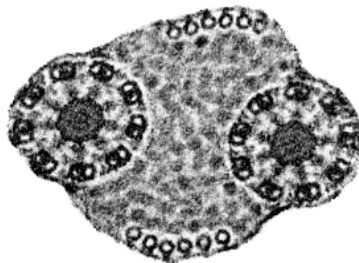
Katedra parazitologie

Bakalářská práce

Lenka ŠÍPKOVÁ



**Spermiogeneze a ultrastruktura spermií tasemnice
Parabothriocephalus gracilis (Eucestoda),
cizopasníka bathypelagické ryby *Psenopsis anomala***



Školitel: Céline Levron, PhD.

Duben 2008

Bakalářská práce

Šípková Lenka 2008: Spermiogeneze a ultrastruktura spermií tasemnice *Parabothriocephalus gracilis* (Eucestoda), cizopasníka bathypelagické ryby *Psenopsis anomala*.

[Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the tapeworm *Parabothriocephalus gracilis* (Eucestoda), a parasite of the bathypelagic fish *Psenopsis anomala*. Bc. Thesis, in Czech] – 32 p., University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the tapeworm *Parabothriocephalus gracilis* were examined using transmission electron microscopy (TEM). Spermiogenesis is characterised by the formation of a zone of differentiation with two centrioles associated with striated rootlets, and an intercentriolar body between them. The two flagella undergo a rotation of 90° until they become parallel to the median cytoplasmic process with which they fuse. Electron-dense material is present in the apical region of the zone of differentiation in the early stages of spermiogenesis. This electron-dense material is characteristic for the orders Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea. The mature spermatozoon contains two axonemes of the 9 + “1” trepaxonematan pattern, nucleus, cortical microtubules, and electron-dense granules of glycogen. Mitochondria are absent. The anterior extremity of the spermatozoon exhibits a single electron-dense crested body. One of the most interesting features is the presence of a ring of cortical microtubules surrounding the axoneme. This character has been reported only for species of the order Bothriocephalidea and may be unique in this cestode group.

Tato práce byla financována z grantu školitele (GA ČR – projekt č. 524/04/0342 a 524/07/P039, a CZV „Ichtyo–parazitologie“ – LC 522).

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 24. 4. 2008

.....
Lenka Šípková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomohli s vypracováním této práce. Zejména své školitelce Dr. Céline Levron za pomoc, příjemné jednání a trpělivost po celou dobu mé práce a za čas, který mi věnovala. Dále děkuji Prof. Tomášovi Scholzovi za odborné rady při psaní mé bakalářské práce a personálu Laboratoře elektronové mikroskopie za všestrannou pomoc. Také děkuji Dr. Marku Freemanovi za poskytnutí materiálu.

OBSAH

1. ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED	- 5 -
1.1. KMEN PLATYHELMINTHES	- 5 -
1.2. NEODERMATA	- 6 -
1.3. CESTODA (TASEMNICE)	- 6 -
1.3.1. REPRODUKČNÍ SOUSTAVA TASEMNIC	- 7 -
1.3.2. ŘÁD BOTHRIOCEPHALIDEA	- 8 -
1.3.3. <i>PARABOTHRIOCEPHALUS GRACILIS</i>	- 9 -
1.4. VÝZNAM SPERMIOGENEZE A ULTRASTRUKTURY SPERMÍÍ U HELMINTŮ	- 11 -
1.5. SPERMIOGENEZE A STAVBA SPERMÍÍ U TASEMNIC ŘÁDŮ BOTHRIOCEPHALIDEA A DIPHYLLOBOTHRIIDEA	- 13 -
2. CÍLE PRÁCE	- 14 -
3. MATERIÁL A METODY	- 15 -
3.1. MATERIÁL	- 15 -
3.2. METODY	- 15 -
3.2.1. PŘÍPRAVA MATERIÁLU PRO TRANSMISNÍ ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII	- 15 -
3.2.2. ZPRACOVÁNÍ ŘEZŮ A TVORBA FOTOGRAFIÍ	- 16 -
4. VÝSLEDKY	- 17 -
4.1. SPERMIOGENEZE TASEMNICE <i>PARABOTHRIOCEPHALUS GRACILIS</i>	- 17 -
4.2. CHARAKTERISTIKA SPERMÍÍ TASEMNICE <i>PARABOTHRIOCEPHALUS GRACILIS</i>	- 20 -
5. DISKUSE	- 24 -
6. SOUHRN	- 28 -
7. POUŽITÁ LITERATURA	- 29 -

1. ÚVOD A LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1. KMEN PLATYHELMINTHES

Plathelminți (ploštěnci) jsou bilaterální, dorzoventrálně zploštělí, volně žijící i parazitická živočichové. V prostoru mezi pokožkou ektodermálního původu a slepě zakončeným střevem vzniklým z entodermu mají třetí zárodečnou vrstvu buněk – mesoderm. Tato tkáň je přítomna ve formě parenchymu, který je tvořen silně vakuolizovanými, tenkostěnnými a velkými buňkami. Pro tento typ mesodermu se používá název mesenchym a jsou v něm uloženy vnitřní tělní orgány. Pokožka (epidermis) je u volně žijících ploštěnců tvořena řasinkovým epitelem z mnohobíčkatých buněk. Tyto řasinky slouží k pohybu. Parazitická ploštěnci (skupina Neodermata) nemají, kromě larev, řasinkovou epidermis, ale vytvářejí nový pokožkový syncytiální epitel, nejspíše mesodermálního původu, nazývaný neodermis nebo tegument (Ehlers 1985).

Pod pokožkou jsou vrstvy okružní a podélné svaloviny, které vytvářejí podkožní svalový vak. Oběhová soustava a dýchací orgány nejsou vytvořeny. Transport živin se děje difúzí v mesenchymu a dýchání probíhá povrchem těla. Trávicí soustava je trubicovitá, často bohatě větvená, avšak u tasemnic chybí. Vylučovacími orgány jsou párovitá protonefridia, tvořená spojením plaménkové buňky a sběrného kanálku. Nervová soustava je soustředěna na přední tělo ve formě párového ganglia či skupiny ganglií. Ploštěnci mají dobře vyvinuté hmatové, zrakové a čichové smyslové orgány (Roberts a Janovy 2005).

Většina ploštěnců je typickými hermafrodity s procesem výměny samčích pohlavních buněk mezi dvěma jedinci (samooplození je vzácné). Pohlavní orgány jsou dobře vyvinuté, tvořené kromě vlastních pohlavních žláz dalšími přídatnými orgány. Vyskytuje se u nich také nepohlavní rozmnožování a u mnohých je zachována schopnost regenerace. Parazitická ploštěnci mají často složité vývojové cykly spojené se střídáním hostitelů (Roberts a Janovy 2005).

Původní klasifikace do tříd ploštěnky (Turbellaria), motolice (Trematoda), monogenea (Monogenea) a tasemnice (Cestoda) neodpovídá současným názorům na fylogenetické vztahy. Třída Turbellaria tvoří polyfyletický taxon, který zahrnuje nepříbuzné skupiny. Acoelomorpha tvoří samostatnou skupinu na bázi bilaterií, zatímco ostatní ploštěnci tvoří

taxon Platyhelminthes patřící do skupiny Lophotrochozoa a zahrnující také parazitickou skupinu Neodermata, která tvoří monofyletickou skupinu (Zrzavý 2006).

1.2. NEODERMATA

Skupina Neodermata zahrnuje výlučně parazitické ploštence. Řasinkový kožní epitel je zachován pouze u některých larválních stádií. Při transformaci larvy v dospělé (či infekční larvu) je původní pokožka (epidermis) odvržena a kompletně nahrazena syncytiálním epitelem (tegument), nazývaným také neodermis (Ehlers 1985). Je to multifunkční systém, který se mimo jiné podílí na přenosu živin do těla a na jejich přeměně v potřebnou energii ve formě ATP. Tegument obsahuje četné mitochondrie. Zřejmě umožňuje obranu proti reakcím těla hostitele, proto je asi tato skupina tak úspěšná v parazitaci. Podle některých názorů jsou Neodermata řazena do podkmene Rhabditophora (Rohde 1994). Tato skupina je charakterizována vytvářením tyčinkových inkluzí (rhabditů) v podpokožkových buňkách. Po vyloučení z těla bobtnají ve slizovitou vrstvu a slouží jako ochrana před vyschnutím, obrana před nepřítelem, k pohybu či ke znehybnění kořisti. Rhabdity ale nebyly u neodermat spolehlivě prokázány (Ehlers 1986). Je možné, že jejich nepřítomnost byla způsobena ztrátou primárního ektodermu během evoluce. Do skupiny Neodermata řadíme třídy Trematoda (motolice), Cestoda (tasemnice) a Monogenea (Sedlák 2005).

1.3. CESTODA (TASEMNICE)

Tasemnice jsou výhradně parazitickou skupinou plathelminťů (ploštenců), která je charakterizována především absencí střeva a přítomností mikrotrichů. Až na výjimečné případy se jedná o parazity s nepřímými (vícehostitelskými) životními cykly. Všechny tasemnice mají larvu opatřenou embryonálními háčky buď v počtu 10 (primitivní skupiny Gyrocotylidea a Amphilinidea) nebo 6 („typické“ tasemnice Eucestoda). Drtivá většina tasemnic jsou cizopasníky zažívacího traktu obratlovců. Vlastní tasemnice, Eucestoda, sdružují s výjimkou řádu Caryophyllidea a Spathebothriidea zástupce s článkovaným tělem – strobilou se segmenty. Každý článek (segment) obsahuje nejčastěji jeden, někdy i dva a více pohlavních komplexů (Smyth a MacManus 1989).

Dosud bylo popsáno kolem 4000 druhů tasemnic podtřídy Eucestoda. Nejvyšší počet řádů se vyskytuje u vodních obratlovců (paryby a ryby), avšak druhově je zdaleka nejpočetnější skupinou řád Cyclophyllidea, jehož zástupci cizopasí především u ptáků a savců. Mezi tasemnicemi nalézáme řadu důležitých cizopasníků člověka, ale také druhů veterinárně významných. Tasemnice jsou rovněž důležitou skupinou z hlediska studia biochemie, embryologie, fyziologie a molekulární biologie (Smyth a MacManus 1989).

1.3.1. REPRODUKČNÍ SOUSTAVA TASEMNIC

Tasemnice jsou většinou hermafroditi a mají v každém článku samčí i samičí reprodukční soustavu. Někdy jsou reprodukční sady zdvojeny (např. rod *Dipylidium*) nebo jsou mnohočetné (rod *Tetragonoporus*). Tasemnice mohou mít některé zvláštnosti rozmnožovací soustavy: samčí reprodukční soustava obsahuje u většiny skupin mnoho varlat, samičí může zahrnovat početné žlutkové folikuly ve velké části segmentu (Bothriocephalidea) nebo kompaktní žlutkovou žlázu (Cyclophyllidea). Součástí samičí soustavy je i vagina. Vývody obou pohlavních soustav ústí často do společného genitálního atria (Volf a Horák 2007).

K oplození nejčastěji dochází mezi dvěma tasemnicemi nebo mezi články na stejné strobile (především u velkých druhů tasemnic, které jsou samy ve střevě). Tasemnice jsou oviparní a jejich vajíčka se do vnějšího prostředí dostávají se stolicí definitivního hostitele. Ve vajíčku primitivních tasemnic (Gyrocotylidea a Amphilinidea) se tvoří larva 1. stádia (v mateřském organismu nebo ve vnějším prostředí), tzv. lykofora. U zástupců Eucestoda se vytváří larva zvaná onkosféra (hexakant se třemi páry háčků). Ta může být někdy obklopena ciliárním epitelem pro pohyb ve vodě a je označována jako koracidium. Larvy dalších stádií nazýváme metacestody a podle morfologie mají různé názvy (Chervy 2002).

Spermie tasemnic (Eucestoda) jsou nitřovité. Na začátku spermiogeneze je 64 spermatid. Během spermiogeneze se vytváří spermie se dvěma axonemami nebo spermie s jednou axonemou, vždy se vzorem 9 + "1" (Trepaxonemata). Dále je přítomno protáhlé jádro a podélné kortikální mikrotubuly. Pod buněčnou membránou byla u některých tasemnic (Bothriocephalidea, Diphyllbothriidea, Diphyllidea, "Tetraphyllidea", Proteocephalidea, Tetrabothriidea, Cyclophyllidea) nalezena elektrodenní organela zvaná hřebcovité tělísko (crested body). Mitochondrie se vyskytují v raných stádiích spermatidů, zatímco ve zralých spermích vždy chybějí (Justine 1998).

Spermiogeneze a ultrastruktura spermií u Eucestoda je srovnávána s ostatními parazitickými plathelmintry s důrazem kladeným na fylogeneticky významné struktury. Za synapomorfii u Eucestoda se považuje absence mitochondrií v dospělé spermii a přítomnost hřebenovitého tělíska (Justine 1998).

1.3.2. ŘÁD BOTHRIOCEPHALIDEA

Současné taxonomické studie prokázaly, že se řád Pseudophyllidea (štěrbínovky) skládá ze dvou nepříbuzných taxonů: Diphyllbothriidea a Bothriocephalidea (Kuchta a kol. 2008). Bothriocephalidea se liší od Diphyllbothriidea v následujících znacích: genitální póry (póry cirového vaku a vaginy) jsou u Bothriocephalidea ve středu (mediánní), či u kraje (sublaterální) nebo na kraji (laterální) dorsální strany segmentu, zatímco u Diphyllbothriidea se nacházejí výhradně ve středu ventrální strany segmentu. Děložní pór je u Bothriocephalidea umístěn před genitálním pórem (anteriorně), zatímco u Diphyllbothriidea je za genitálním pórem. Vnější semenný váček (receptaculum seminis) u zástupců řádu Bothriocephalidea chybí, ale je přítomen děložní vak (uterine sac). U řádu Diphyllbothriidea se vnější semenný váček vyskytuje, ale chybí děložní vak (Kuchta a kol. 2008).

Skupina Diphyllbothriidea, zahrnující cizopasníky čtyřnožců (tetrapoda), patří mezi primitivnější tasemnice (Brabec a kol. 2006). Naproti tomu skupina Bothriocephalidea zahrnuje především cizopasníky mořských a sladkovodních ryb. Řád Bothriocephalidea, skládající se ze 45 rodů seskupených ve 4 čeledích, tvoří sesterskou skupinu k tzv. acetabulárním (tetrafosátním) tasemnicím, které jsou většinou považovány za odvozenou skupinu (Olson a kol. 2001; Kuchta a kol. 2008). Patří sem např. zástupci největšího a lékařsky významného řádu Cyclophyllidea (kruhovky), zahrnující nejvýznamnější cizopasníky člověka (Khalil a kol. 1994; Müller 2002).

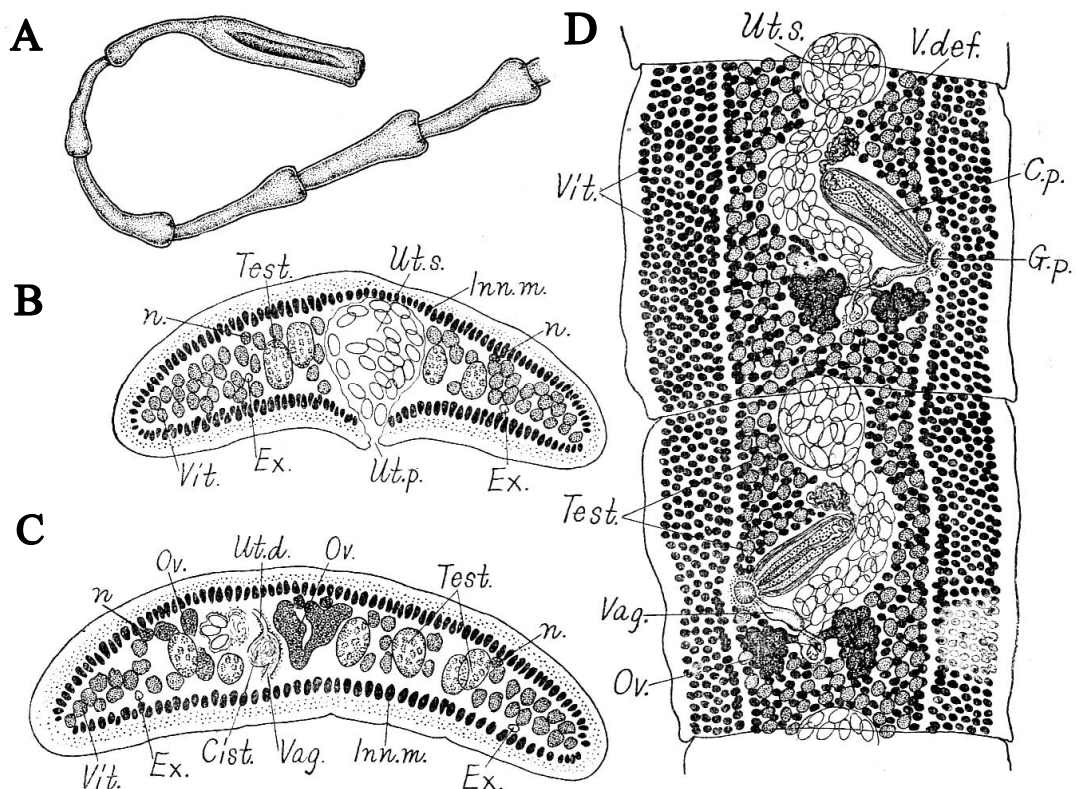
Bothriocephalidea jsou malé až středně velké tasemnice parazitující ve střevě obratlovců, především u mořských ryb, výjimečně u obojživelníků. Mají jednoho či dva meziphostitele. Jejich strobila má zpravidla kraspedotní segmenty, které jsou obvykle širší než delší. Segmentace je úplná nebo neúplná, vzácně chybí. Skolex je tvarově proměnlivý, neozbrojený, vzácně je opatřen háčky. Na dorsální a ventrální straně skolexu se nacházejí dvě přísavné rýhy (bothrie), které jsou odlišného tvaru a hloubky. Může se vyskytovat apikální disk a krček (Bray a kol. 1994; Kuchta a kol. 2008).

Reprodukční orgány se nacházejí jednotlivě v segmentu, vzácně jsou zdvojené. Články těchto tasemnic obsahují vždy roztroušené početné žloutkové folikuly a početná varlata obvykle uspořádaná ve dvou laterálních polích. Chámovod (vas deferens) je stočený. Cirový vak může obsahovat vnitřní semenný váček. Cirus je většinou neozbrojený, ale může být opatřen trny nebo tegumentárními výrůstky. Vaječník je umístěn v medule, obvykle je dvoulaločnatý, kompaktní, folikulární nebo dendritický v zadní části segmentu. Děloha je různého tvaru, rozdělena na děložní trubici (uterine duct) tvořící kličky a děložní vak (uterine sac). Vajíčka jsou zpravidla opatřena víčkem (operculum) nebo jsou bez víčka. Vajíčka mohou obsahovat zformovanou larvu (onkosféru) již v děloze nebo dochází k jejímu vývoji ve vodě. U řady druhů je povrch onkosféry pokryt řasinkami, které umožňují této larvě zvané koracidium pohyb ve vodě. Vývoj probíhá přes jednoho nebo dva meziphostitele (Bray a kol. 1994; Kuchta a kol. 2008).

1.3.3. *PARABOTHRIOCEPHALUS GRACILIS* Yamaguti, 1934

Tento druh patří do čeledi Echinophallidae Schumacher, 1914. Vyskytuje se v tenkém střevě bathypelagické ryby druhu *Psenopsis anomala* (Perciformes: Centrolophidae) v Tichém oceánu (Yamaguti 1934; Wang 2004). Tělo tasemnice dosahuje délky až 60 mm a je maximálně 1,4 mm široké. Strobila má kraspedotní segmenty, jejichž posterolaterální okraje jsou pokryty velkými mikrotrichy. Je přítomna vnější i sekundární segmentace, vnější segmentace však může být v gravidních segmentech neúplná. Na podlouhlém neozbrojeném skolexu se nacházejí dvě protáhlé mělké bothrie, ale není zde zřetelný apikální disk. Krček chybí (Yamaguti 1934; Kuchta a kol. 2009).

Varlata umístěná ve dvou laterálních polích se sbíhají dozadu a pokračují mezi segmenty. Cirový vak je středně velký až velký, silnostěnný, cirus je ozbrojen trny. Genitální pór je sublaterální. Vaječník má dvě nesouměrná, silně laločnatá křídla. Vagina se v koncové části rozšiřuje, v přední části této rozšířené oblasti je ozbrojena malými trny. Vaginální svěrač (vaginal sphincter) může být přítomen. Žloutkové folikuly jsou umístěny v kortexu. Děložní trubice vytváří četné kličky a rozšiřuje se v gravidních segmentech. Děložní vak je oválný a nezvětšuje se s dozráváním segmentů. Děložní pór je středový, blízko předního okraje segmentu. Vajíčka jsou opatřena víčkem (operculum) a jsou v děloze neembryovaná (Yamaguti 1934; Kuchta a kol. 2009).



Obr. 1. *Parabothriocephalus gracilis* Yamaguti, 1934. Ilustrace z originálního popisu druhu (Yamaguti 1934 – fig. 49–52).

A – Skolex.

B, C – Gravidní segmenty, příčné řezy.

D – Gravidní segmenty.

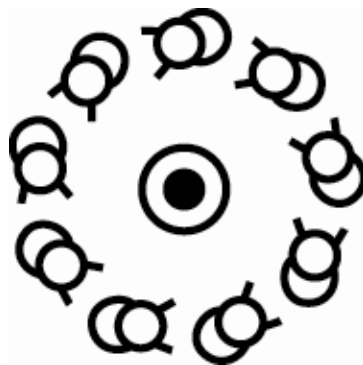
Vysvětlivky:

Cist. – semenný váček (*receptaculum seminis*), **C. p.** – cirový vak, **Ex.** – osmoregulační kanál, **G. p.** – genitální pór, **Inn. m.** – vnitřní podélná svalovina, **N.** – hlavní nerv, **Ov.** – vaječník, **Test.** – varlata, **Ut. d.** – děložní trubice, **Ut. p.** – děložní pór, **Ut. s.** – děložní váček, **Vag.** – vagina, **V. def.** – chámovod, **Vit.** – žloutkové trsy.

1.4. VÝZNAM SPERMIOGENEZE A ULTRASTRUKTURY SPERMIÍ U HELMINTŮ

Spermiogeneze a ultrastruktura spermií patří mezi důležité znaky pro evoluční studium. První použil spermatologické znaky pro studium fylogenetických vztahů Hendelberg (1969) u ploštěnek ("Turbellaria"). Použití kladistických metod, které začlenily spermatologické znaky do fylogenetických analýz, dává těmto studiím nový směr (Hoberg a kol. 1997). Ehlers (1984, 1985, 1986), Brooks (1989) a Brooks a McLennan (1993) zahrnuli znaky spermií pro definování některých hlavních skupin helmintů. V současné době jsou znaky na spermiích považovány za důležité pro studium fylogeneze plathelminů (Justine 1998).

Neodermata patří do taxonu Trepaxonemata, který dále zahrnuje skupiny Polycladida, Seriata, Prolecitophora, Typhloplanoida a Dalyellioida (Ehlers 1986). Taxon Trepaxonemata byl navržen Ehlersem (1984) a jméno tohoto taxonu vychází ze struktury axonemy 9 + "1", která byla nalezena u těchto plathelminů. Jméno Trepaxonemata znamená „axonema ve spirále“ a poukazuje na strukturu centrálního jádra u axonemy 9 + "1". Na rozdíl od axonem většiny eukaryot, ve kterých převládá vzor 9 + 2, axonema trepaxonemat obsahuje centrální jádro, které se jeví v podélném řezu jako spirála. U vzoru 9 + 2 počet 2 poukazuje na přítomnost dvou jednozávitových mikrotubulů ve středu a počet 9 ukazuje na devět periferních párů mikrotubulů.



Obr. 2. Axonema vzoru 9 + "1".

U vzoru 9 + "1" číslo 1 poukazuje na přítomnost jednoduché struktury a apostrofy značí, že nalezená jednoduchá struktura není složena z mikrotubulů (Justine a Mattei 1981). Potvrdily to nedávné imunocytochemické studie, které zjistily, že centrální jádro u vzoru 9 + "1" neobsahuje tubulin. Ačkoliv tyto studie pracovaly pouze se zástupci moto-

lic (Digenea), značná shoda v ultrastruktuře tohoto znaku naznačuje, že tyto závěry platí pro všechna Trepaxonemata. Vzácné výjimky u axonem mohou být rozděleny do dvou kategorií: odchylka od axonemy 9 + "1" a bezbičíkatá spermie (Justine 2001).

Spermiogeneze a stavba spermií jsou u většiny plathelminů stejného typu. Patří sem Monogenea, Digenea, Aspidogastrea, Gyrocotylidea, Amphilinidea a Eucestoda. Během spermiogeneze splynou spermatidy v cytoplazmatický celek, který se skládá ze 32–64 buněk. Výjimku tvoří schistosomy, u kterých jsou spermatidy oddělené (Justine 1991). Součástí každé spermatidy je oblast zvaná diferenciacní zóna. Jedná se o kuželovitou zónu, ze které se vytvářejí tři prodlužující se výrůstky. Jsou to střední cytoplazmatický výrůstek s ventrálními a dorsálními mikrotubuly a dva laterální bičíky. Tyto tři prvky se spojují dohromady, prodlužují se a následně vytvářejí dospělou spermii. Fylogeneticky významným jevem u spermiogeneze plathelminů je proximodistální fúze, která byla považována za společný znak pro Cercomeridea (Justine 1991). Aby vznikla spermie se dvěma včleněnými axonemami, musí dojít ke splnutí dvou bičíků se středním cytoplazmatickým výrůstkem. Tato fúze postupuje z předního konce spermatidu k jeho zadnímu konci. Výsledkem proximodistální fúze je vznik dorsálních a ventrálních mikrotubulů v jaderné oblasti spermie. Tyto mikrotubuly pocházejí z mikrotubulů středního cytoplazmatického výrůstku. Dospělá spermie vytvořená tímto postupem obsahuje dvě axonemy, kortikální mikrotubuly, jádro a mitochondrii (chybí u Eucestoda). Jádro se během spermiogeneze prodlužuje a migruje k zadnímu konci spermatidy (Hendelberg 1962). Přítomnost jádra ve spermii parazitických plathelminů značí její zadní konec, zatímco jeho absence přední konec (Justine 1998).

Pozorování spermií u motolic (Digenea) prokázalo pohyblivost axonem v přední části spermie (Justine a Mattei 1982). Sledování procesu oplození u motolic (Digenea) ukázalo, že jádro je poslední část spermie, která vstupuje do oocyty (Justine 1998; Justine a Mattei 1984).

Skupina Neodermata sdílí synapomorfii proximodistální fúzi během spermiogeneze. Přehled spermiologických znaků u tasemnic významných pro fylogenetické analýzy představil Justine (1998) a znaky spermií byly s morfologickými a molekulárními znaky použity při studiu fylogeneze Eucestoda (Hoberg a kol. 1997; Hoberg a kol. 2001; Olson a kol. 2001).

Většina znaků na spermiích užitečných pro fylogenezi u plathelminů byla určena s použitím TEM. Zviditelnění axonem pomocí immunocytochemického značení tubulinu a

označení jádra pomocí specifické DNA fluorescenční sondy ukazuje hlavní strukturu spermie. Pozorované znaky zahrnují relativní délku axonem a mikrotubulů, posuny axonem, pozice jádra a počet spermií ve skupinách se shodným genotypem (Mollaret a Justine 1997). Tyto znaky jsou potenciálně vhodné pro fylogenetické studie (Justine 2001).

1.5. SPERMIOGENEZE A STAVBA SPERMIÍ U TASEMNIC ŘÁDŮ BOTHRIOCEPHALIDEA A DIPHYLLOBOTHRIIDEA

Spermioogeneze a stavba spermií byla studována u několika zástupců řádů Bothriocephalidea a Diphyllbothriidea, jenž donedávna tvořily řád Pseudophyllidea. V následující tabulce jsou uvedeni zástupci zmíněných řádů studovaní pomocí elektronového mikroskopu.

Tabulka 1. Přehled zástupců z řádu Bothriocephalidea a Diphyllbothriidea, u nichž byla studována spermioogeneze a stavba spermií.

Druh	Autor
Řád Bothriocephalidea	
<u>Čeleď Bothriocephalidae</u>	
<i>Bothriocephalus clavibothrium</i>	Świderski a Mokhtar-Maamouri 1980
<i>Bothriocephalus claviceps</i> *	Bâ a kol. 2007
<i>Bothriocephalus scorpii</i>	Levron a kol. 2006c
<u>Čeleď Echinophallidae</u>	
<i>Paraechinophallus japonicus</i> *	Levron a kol. 2006a
<i>Parabothriocephalus gracilis</i>	<i>Současná práce</i>
<u>Čeleď Triaenophoridae</u>	
<i>Eubothrium crassum</i>	Bruňanská a kol. 2001, 2002
<i>Triaenophorus nodulosus</i>	Levron a kol. 2005
Řád Diphyllbothriidea	
<u>Čeleď Diphyllbothriidae</u>	
<i>Diphyllbothrium latum</i>	Bonsdorff a Telkkä 1965; Levron a kol. 2006b
<i>Ligula intestinalis</i>	Levron a kol. nepublikované údaje
<u>Čeleď Scyphocephalidae</u>	
<i>Duthiersia fimbriata</i> *	Justine 1986

* studována pouze stavba spermií

2. CÍLE PRÁCE

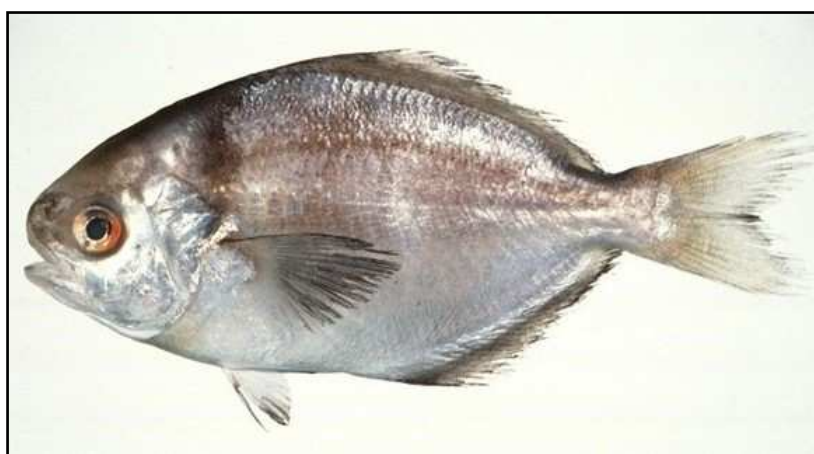
Cíle mé bakalářské práce jsou následující:

1. Provést literární rešerši na stanovené téma.
2. Získat údaje o spermiogenezi tasemnice *Parabothriocephalus gracilis* a stavbě jejích spermií.
3. Porovnat získané údaje s informacemi o ostatních zástupcích řádu Bothriocephali-
dea a Diphyllbothriidea.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. MATERIÁL

Ke studiu byl použit materiál tasemnice *Parabothriocephalus gracilis* Yamaguti, 1934 (Bothriocephalidea – Echinophallidae) poskytnutý Dr. Markem Freemanem (Institute of Aquaculture, Stirling, UK), který tuto tasemnici našel ve střevě hlubokomořské ryby druhu *Psenopsis anomala* (Perciformes: Centrolophidae) z Tichého oceánu v Japonsku v roce 2004.



Obr. 3. *Psenopsis anomala* Temminck a Schlegel, 1844 (Perciformes: Centrolophidae).

3.2. METODY

3.2.1. Příprava materiálu pro transmisní elektronovou mikroskopii

Tasemnice *Parabothriocephalus gracilis* byla po vyjmutí ze střeva opláchnuta ve fyziologickém roztoku, nakrájena na malé kousky a fixována 2,5% roztokem glutaraldehydu v 0,1 M kakodylátovém pufru (pH 7,4). Následovalo propláchnutí ve vypíracím roztoku (0,1 M kakodylátový pufr). Na postfixaci byl použit 1% roztok oxidu osmičelého v 0,1 M kakodylátovém pufru v poměru 1 : 1. Poté byly vzorky znovu propláchnuty v 0,1 M kakodylátovém pufru, odvodněny vzestupnou acetonovou řadou a zality do kapslí s pryskyřicí Spurr.

3.2.2. Zpracování řezů a tvorba fotografií

Ultratenké řezy (tloušťka 60–90 nm) byly krájeny diamantovým nožem na ultramikrotomu Leica Ultracut UCT a sbírány na měděné sítky. Následovalo jejich kontrastování uranyl acetátem a citrátem olova podle Reynoldse (1963). U některých vzorků byla provedena ultrastrukturní vizualizace glykogenu metodou Thiéry (1967). Tato metoda spočívá v postupné aplikaci kyseliny jodisté (PA), thiosemikarbazidu (TSC) a proteinátu stříbra (SP).

Ultratenké řezy byly prohlíženy pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL 1010 při urychlovacím napětí 80 kV (obr. 4). Snímky, zachycující ultrastrukturu spermiogeneze a spermií, byly pořízeny CCD kamerou a poté zpracovány v programech Adobe Photoshop a Adobe Illustrator (Laboratoř elektronové mikroskopie, Biologické centrum AV ČR – Parazitologický ústav).



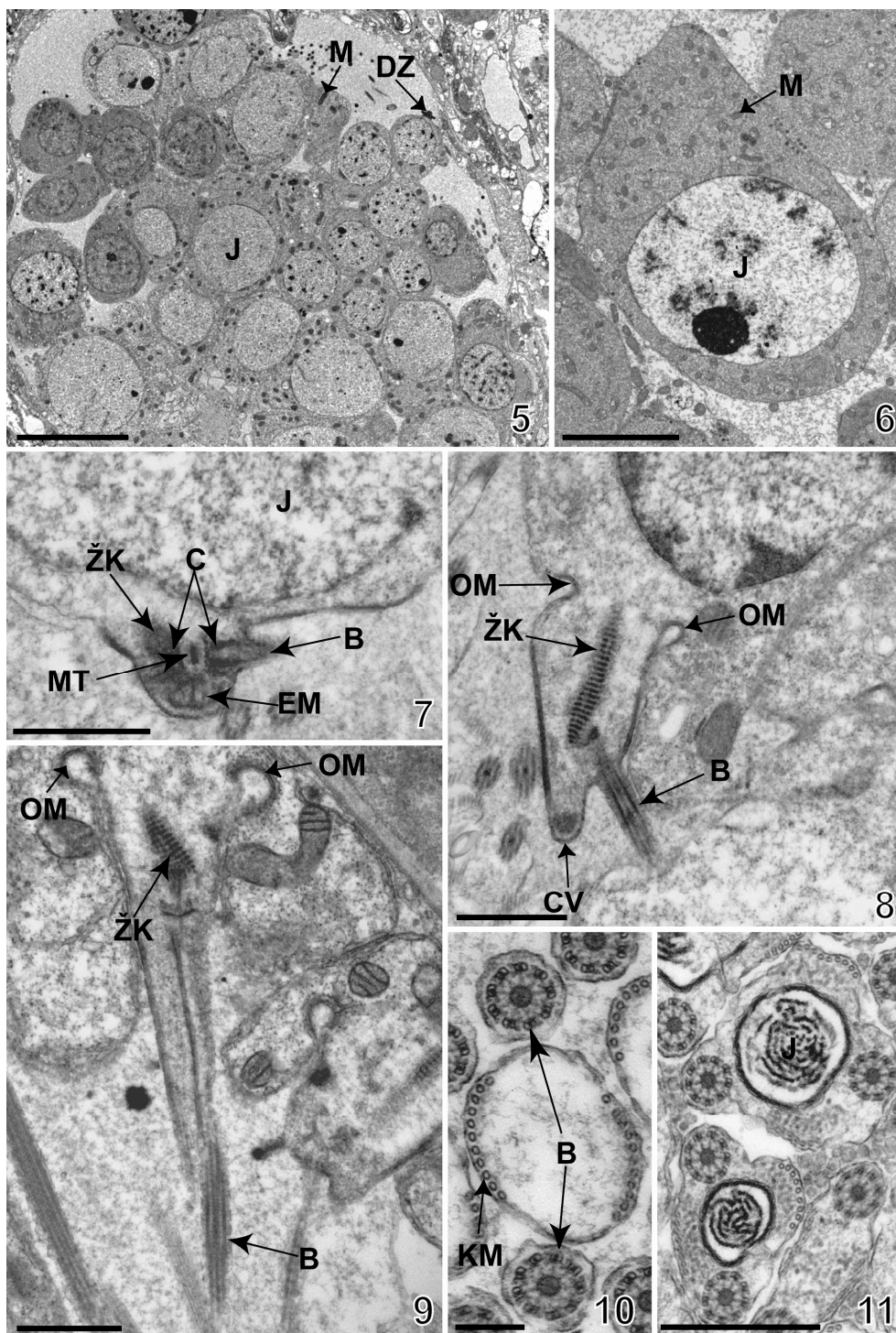
Obr. 4. Transmisní elektronový mikroskop JEOL 1010.

4. VÝSLEDKY

4.1. SPERMIOGENEZE TASEMNICE *PARABOTHRIOCEPHALUS GRACILIS*

Zkoumala jsem ultrastrukturu spermiogeneze a spermií tasemnice *Parabothriocephalus gracilis*. Spermie této tasemnice se vyskytují shloučené ve varlatech. V počáteční fázi spermiogeneze jsou přítomny spermatidy s velkým jádrem a mitochondriemi (Obr. 5, 6). Na okraji každé spermatidy se začíná objevovat diferenciační zóna, ze které se postupně utváří dospělá spermie (Obr. 5). Tato zóna obsahuje dvě centrioly propojené s mezicentriolárním tělískem (Obr. 7 a 12 A). Toto tělísko cylindrické struktury se skládá z jedné centrální tlustší elektrodenzní destičky a dvou tenčích elektrodenzních destiček na každé straně (Obr. 7 a 12 A). Mezi těmito destičkami jsou dvě vrstvy dobře prostupné pro elektrony (electron-lucent). Každá centriola je spojena s žíhanými kořeny, což je kuželovitá struktura složená z elektrodenzních pruhů (Obr. 7–9 a 12 A, B). Tento elektrodenzní materiál (Obr. 7) se vyskytuje v prvních stádiích spermiogeneze. Diferenciační zóna je vymezena klenutými membránami (Obr. 8, 9 a 12 B–D).

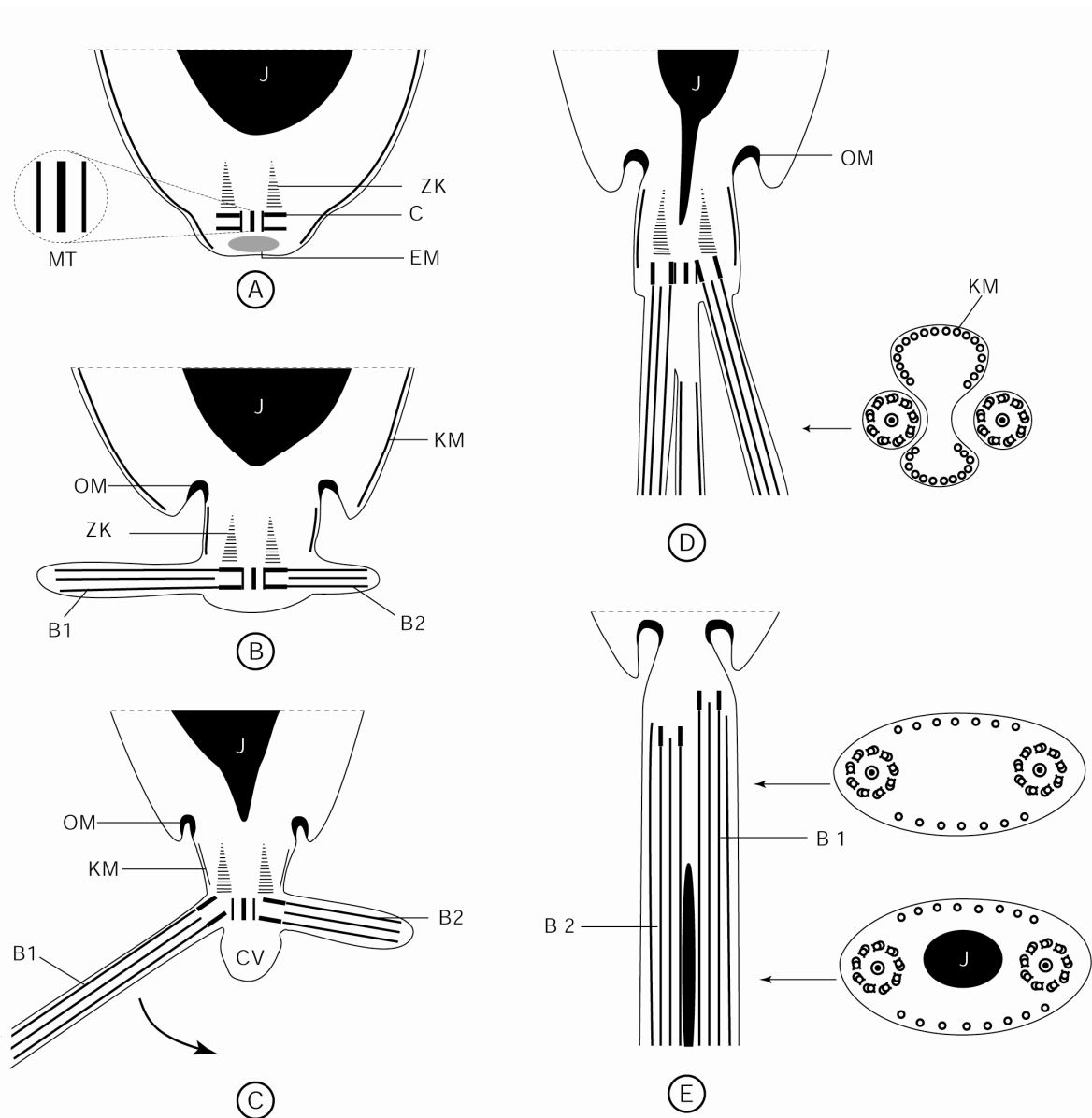
Zpočátku jsou obě centrioly orientovány ve stejné rovině (Obr. 7 a 12 A, B). Každá centriola dává vzniknout jednomu bičíku (Obr. 7 a 12 B, C). Následně je v distální části diferenciační zóny formován centrální cytoplazmatický výrůstek (Obr. 8 a 12 C). Dva bičíky nestejně délky rostou rychle a prodělávají kolmou rotaci (Obr. 12 C, D). Poté se stávají souběžné s centrálním cytoplazmatickým výrůstkem a splývají s ním proximo-distálně (Obr. 9, 10 a 12 E). Jádro se začíná prodlužovat a migruje do centrálního cytoplazmatického výrůstku (Obr. 11 a 12 C–E). Jádro se nachází v zadním konci spermie. Na konci spermiogeneze je oblast klenutých membrán zaškrcena a zralá spermie se odělí od zbylé cytoplazmy.



Obr. 5–11. Spermioogeneze tasemnice *Parabothriocephalus gracilis*.

Vysvětlivky:

Obr. 5. Podélný řez spermatid s velkým jádrem (J) a mitochondriemi (M). Utváří se diferenciační zóna (DZ). Měřítka 10 μ m. **Obr. 6.** Detail spermatidy s jádrem (J) a mitochondriemi (M). Podélný řez. Měřítka 5 μ m. **Obr. 7.** Diferenciační zóna se dvěma centriolami (C), mezicentriolárním tělískem (MT), žhanými kořeny (ŽK), bičkem (B) a elektrodenzním materiálem (EM). Podélný řez. Měřítka 1 μ m. **Obr. 8.** Prodlužování cytoplazmy (CV), každá centriola dává vzniknout jednomu bičku. Vidíme oblast klenutých membrán (OM) a kolmou rotaci bičku (B). Podélný řez. Měřítka 1 μ m. **Obr. 9.** Proximodistální fúze dvou bičků (B) s centrálním cytoplazmatickým výrůstkem. Podélný řez. Měřítka 1 μ m. **Obr. 10.** Proximodistální fúze dvou bičků (B) s centrálním cytoplazmatickým výrůstkem. Pozorujeme přítomnost kortikálních mikrotubulů (KM). Příčný řez. Měřítka 200 nm. **Obr. 11.** Migrace jádra (J) do centrálního cytoplazmatického výrůstku. Příčný řez. Měřítka 500 nm.



Obr. 12. Schéma jednotlivých fází (A–E) spermiogeneze tasemnice *Parabothriocephalus gracilis*.

Vysvětlivky:

B1, B2 – bičíky, **C** – centriola, **CV** – cytoplasmatický výrůstek, **EM** – elektrodenzní materiál, **J** – jádro, **KM** – kortikální mikrotubuly, **MT** – mezicentriolární tělísko, **OM** – oblast klenutých membrán, **ZK** – žíhané kořeny.

4.2. CHARAKTERISTIKA SPERMII TASEMNICE

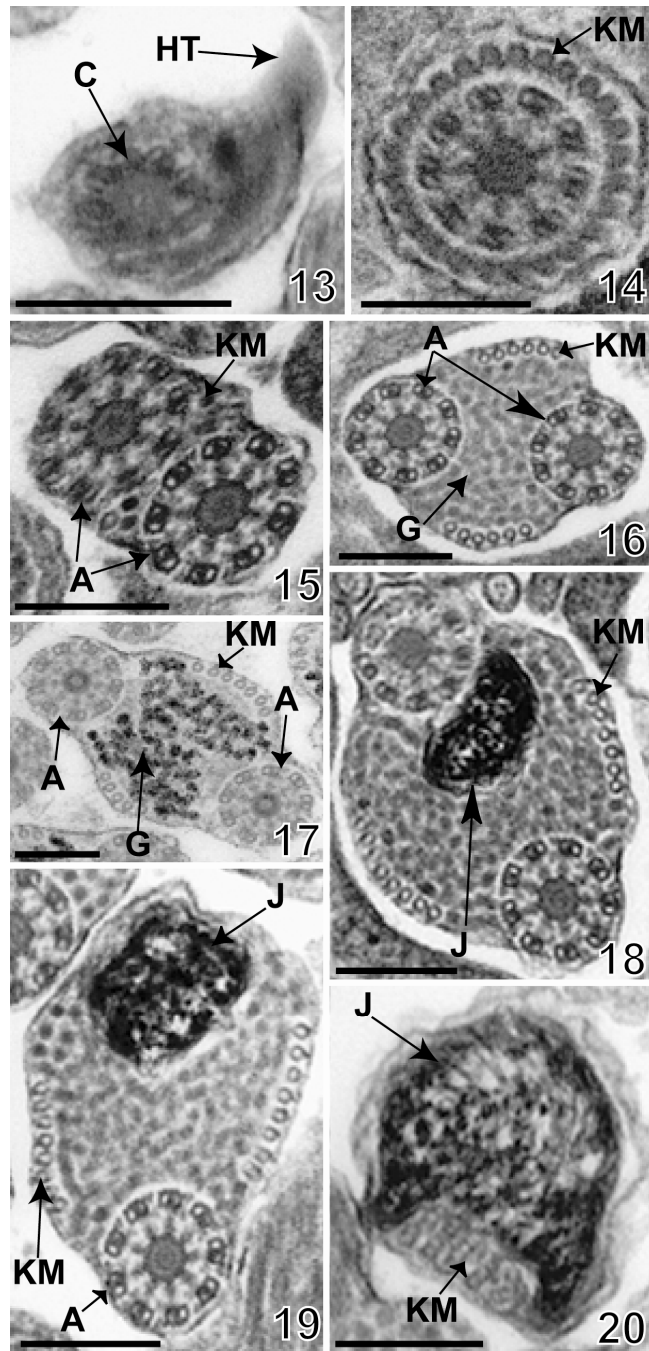
PARABOTHRIOCEPHALUS GRACILIS

Dospělá spermie tasemnice *Parabothriocephalus gracilis* je dlouhá niťovitá buňka, která se zužuje na obou koncích. Mitochondrie chybí. Od předního konce spermie k jejímu zadnímu konci rozeznáváme pět oblastí s charakteristickými ultrastrukturálními znaky.

Oblast I (Obr. 13, 14 a 21 I) představuje přední konec spermie. Je charakterizována přítomností centrioly a elektrodenzním hřebenovitým tělískem (crested body – Obr. 13). Z centrioly vzniká axonema vzoru 9 + “1” (Trepaxonemata). Poté mizí hřebenovité tělísko a kortikální mikrotubuly utvářejí prstenec obklopující axonemu (Obr. 14). Tyto mikrotubuly jsou charakterizovány tlustou membránou a světlým středem, dobře prostupným pro elektrony. Na konci oblasti I je spermie přibližně 260 nm široká.

Oblast II (Obr. 15, 16, 17 a 21 II) je charakterizována přítomností dvou axonem a elektrodenzními granulemi glykogenu. V přední části této oblasti se objevuje centriola druhé axonemy. Ve stejnou dobu se prstenec z kortikálních mikrotubulů rozpadá a postupně mizí. Obě axonemy jsou velmi blízko u sebe (Obr. 15). Průměr spermie je okolo 420 nm. Axonemy jsou od sebe oddělené kortikálními mikrotubuly obsahujícími tenkou membránu se svítivým elektrodenzním středem (Obr. 15). Následně vzrůstá šířka spermie a dosahuje až 700 nm. Objevuje se 4–6 kortikálních mikrotubulů uspořádaných ve dvou polích.

Oblast III (Obr. 18 a 21 III) obsahuje dvě axonemy, kortikální mikrotubuly, glykogen a jádro. Maximální průměr spermie je 800 nm. Průměr jádra se postupně zvětšuje. Jádro je elektrodenzní s vláknitými kousky chromatinu. Každé pole kortikálních mikrotubulů je složeno z 6–9 jednotek. Na konci této oblasti se začíná jedna axonema rozpadat a nakonec zmizí.



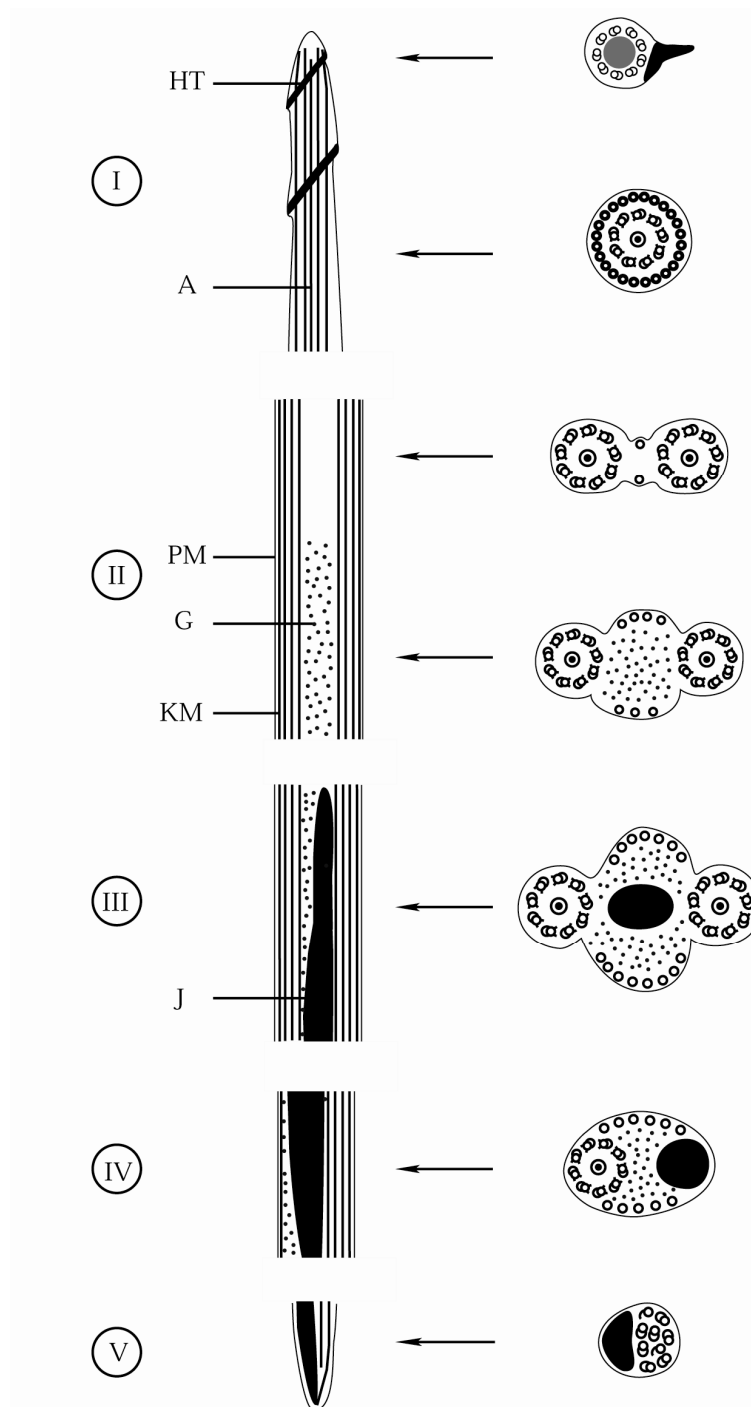
Obr. 13–20. Dospělá spermie tasemnice *Parabothriocephalus gracilis* (příčné řezy).

Vysvětlivky:

Obr. 13 (Oblast I). Přední konec spermie s centriolou (C) a hřebenovitým tělískem (HT). Měřítko 300 nm. **Obr. 14 (Oblast I).** Axonema vzoru 9 + "1" (Trepaxonemata) a prstenec z kortikálních mikrotubulů (KM). Měřítko 200 nm. **Obr. 15 (Oblast II).** Dvě axonemy (A) blízko u sebe oddělené kortikálními mikrotubuly (KM). Měřítko 200 nm. **Obr. 16 (Oblast II).** Dvě axonemy (A), granule glykogenu (G) a kortikální mikrotubuly (KM). Měřítko 200 nm. **Obr. 17 (Oblast II).** Dvě axonemy (A), kortikální mikrotubuly (KM) a granule glykogenu (G) zvýrazněné metodou Thiéry (1967). Měřítko 200 nm. **Obr. 18 (Oblast III).** Dvě axonemy, glykogen a kortikální mikrotubuly (KM). Objevuje se jádro (J). Měřítko 200 nm. **Obr. 19 (Oblast IV).** Jedna axonema (A), jádro (J), kortikální mikrotubuly (KM) a glykogen. Měřítko 200 nm. **Obr. 20 (Oblast V).** Zadní konec spermie s jádrem (J) a jednoduchými kortikálními mikrotubuly (KM). Měřítko 200 nm.

Oblast IV (Obr. 19 a 21 IV) se vyznačuje přítomností jedné axonemy, jádra, glykogenu a kortikálních mikrotubulů. Průměr gamety je 600–700 nm. Kortikální mikrotubuly jsou stále uspořádány ve dvou polích a složeny z 6–9 jednotek. Mizí v zadní části této oblasti.

Oblast V (Obr. 20 a 21 V) odpovídá zadnímu konci spermie. Je charakterizována postupným rozpadem axonemy. Mizí centrální jádro axonemy a dvojice mikrotubulů ztrácí svá ramena. Páry se začínají rozpadat a nakonec se přemění v jednoduché mikrotubuly. Průměr jádra se zmenšuje. Zadní konec spermie je charakterizován přítomností jádra a několika jednoduchých mikrotubulů. Jejich průměr je okolo 150 nm.



Obr. 21. Schéma jednotlivých oblastí (I–V) spermie tasemnice *Parabothriocephalus gracilis*.

Vysvětlivky:

A – axonema, **G** – glykogen, **HT** – hřebenovité tělísko, **J** – jádro, **KM** – kortikální mikrotubuly, **PM** – plazmatická membrána.

5. DISKUSE

Spermiogeneze

Proces spermiogeneze u tasemnice *Parabothriocephalis gracilis* z čeledi Echinophallidae (řád Bothriocephalidea) je charakterizován rotací bičíků a proximodistální fúzí. U této tasemnice probíhá spermiogeneze prvního typu, která se kromě řádu Bothriocephalidea vyskytuje u řádů Diphyllbothriidea, Trypanorhyncha, Tetraphyllidea a Proteocephalidea (Justine 1998). Tento typ spermiogeneze je považován za primitivní (plesiomorfní) znak u tasemnic Eucestoda (Justine 1998).

Mezicentriolární tělísko u *Parabothriocephalus gracilis* je složeno ze tří elektrodenzních destiček a dvou elektron-lucentních vrstev mezi těmito destičkami. Tento znak byl také pozorován u dalších zástupců řádu Bothriocephalidea (viz Tabulka 2): *Bothriocephalus scorpii* – Levron a kol. (2006c), *Eubothrium crassum* – Bruňanská a kol. (2001, 2002) a *Triaenophorus nodulosus* – Levron a kol. (2005). U čeledi Diphyllbothriidae (řád Diphyllbothriidea) se nacházejí čtyři elektron-lucentní vrstvy (Bonsdorff a Telkkä 1965; Levron a kol. 2006c). Zmenšení počtu vrstev u mezicentriolárního tělíska se objevuje u vyšších tasemnic (Justine 2001). Mezicentriolární tělísko je znak používaný ve fylogenetických studiích na vyšší úrovni klasifikace tasemnic (Hoberg a kol. 1997; Justine 1998, 2001).

V prvních fázích spermiogeneze tasemnice *Parabothriocephalus gracilis* se vyskytuje na vrcholu spermatidy elektrodenzní materiál. Tento materiál byl poprvé zaznamenán u tasemnice *Eubothrium crassum* z řádu Bothriocephalidea – Bruňanská a kol. (2001). Později byl elektrodenzní materiál pozorován u bothriocephalidních tasemnic: *Bothriocephalus scorpii* – Levron a kol. (2006c), *Triaenophorus nodulosus* – Levron a kol. (2005) a u diphyllbothriidních tasemnic: *Diphyllbothrium latum* – Bonsdorff a Telkkä (1965); Levron a kol. (2006b) a *Ligula intestinalis* – Levron a kol. nepublikované údaje (viz Tabulka 2). Elektrodenzní materiál v časně fázi spermiogeneze se zdá být charakteristický pro řády Bothriocephalidea a Diphyllbothriidea, ačkoliv tyto řády netvoří monofyletickou skupinu a nejsou blíže příbuzné (Brabec a kol. 2006; Kuchta a kol. 2008).

Tabulka 2. Výsledky studií spermiogeneze a stavby spermií u zástupců z řádu Bothriocephalidea a Diphyllbothriidea.

Druh	Spermiogeneze			Spermie				Autor
	Typ	MT	EM	Pax	HT	PKM	ZK	
Řád Bothriocephalidea								
<u>Čeď Bothriocephalidae</u>								
<i>Bothriocephalus clavibothrium</i>	I	+	-	2	0	+	A	Šwiderski a Mokhtar-Maamouri 1980
<i>Bothriocephalus claviceps</i>				2	1	částečný		Bâ a kol. 2007
<i>Bothriocephalus scorpii</i>	I	2	+	2	1	+	J	Levron a kol. 2006c
<u>Čeď Echinophallidae</u>								
<i>Paraechinophallus japonicus</i>				2	1	+	J + KM	Levron a kol. 2006a
<i>Parabothriocephalus gracilis</i>	I	2	+	2	1	+	J + KM	Současná práce
<u>Čeď Triaenophoridae</u>								
<i>Eubothrium crassum</i>	I	2	+	2	1	+	A	Bruňanská a kol. 2001, 2002
<i>Triaenophorus nodulosus</i>	I	2	+	2	1	+	A	Levron a kol. 2005
Řád Diphyllbothriidea								
<u>Čeď Diphyllbothriidae</u>								
<i>Diphyllbothrium latum</i>	I	4	+	2	-	-	J	Bonsdorff a Telkkä 1965; Levron a kol. 2006b
<i>Ligula intestinalis</i>	I	4	+	2	-	-	A	Levron a kol. nepublikované údaje
<u>Čeď Scyphocephalidae</u>								
<i>Duthiersia fimbriata</i>				2	1	částečný		Justine 1986

Vysvětlivky:

A – axonema, **EM** – elektrodenzní materiál, **HT** – hřebenovité tělísko (počet), **J** – jádro, **KM** – kortikální mikrotubuly, **MT** – mezicentriolární tělísko (počet elektron-lucentních vrstev), **Pax** – počet axonem, **PKM** – prstenec z kortikálních mikrotubulů, **ZK** – zadní konec spermie, +/- – přítomnost/absence.

Stavba spermie

Spermie *Parabothriocephalus gracilis* má dvě axonemy vzoru 9 + “1” (Trepaxo-nemata – Ehlers 1984). Dvě axonemy byly zaznamenány u řádů Bothriocephalidea a Diphyllbothriidea (Tabulka 2), ale také u Spathebothriidea, Haplobothriidea, Trypanorhyncha, Tetraphyllidea a Proteocephalidea (Justine 1998). Dvě axonemy vzoru 9 + “1” se vyskytují u všech Eucestoda a jsou považovány za plesiomorfni znak (Justine 1998). U odvozenějších tasemnic zahrnujících skupinu Cyclophyllidea je přítomna pouze jedna axonema (Justine 1998; Miquel a kol. 2007).

Důležitým znakem zjištěným u tasemnice *Parabothriocephalus gracilis* je přítomnost hřebenovitého tělíska (crested body). Hřebenovité tělísko se vyskytuje u všech dosud studovaných zástupců z řádu Bothriocephalidea kromě druhu *Bothriocephalus clavibothrium* – Świderski a Mokhtar-Maamouri (1980), kde nebylo pozorováno. Tento znak chybí u čeledi Diphyllbothriidae (řád Diphyllbothriidea), ale je přítomen u *Duthiersia fimbriata* z čeledi Scyphocephalidae stejného řádu. I přes absenci tělíska u řady tasemnic Bâ a Marchand (1995) navrhli tento znak jako společný pro všechny “pravé” tasemnice (Eucestoda). Hřebenovité tělísko však chybí u většiny evolučně starších tasemnic jako jsou Caryophyllidea, Spathebothriidea, Haplobothriidea a Trypanorhyncha (MacKinnon a Burt 1985; Świderski a Mackiewicz 2002; Bruňanská a kol. 2006; Miquel a kol. 2007). Justine (1998) později navrhl, aby přítomnost hřebenovitého tělíska byla považována za společný znak pouze pro odvozené tasemnice, zahrnující také řady Bothriocephalidea a Diphyllbothriidea. Existující údaje včetně výsledků předkládané práce však tuto domněnku nepotvrzují (viz Tabulka 2). V předním konci spermie se u bothriocephalidních tasemnic nachází charakteristický prstenec z kortikálních mikrotubulů, které obklopují axonemu (Tabulka 2). Tento znak nebyl pozorován u tasemnic *Diphyllbothrium latum* a *Ligula intestinalis* z čeledi Diphyllbothriidae řádu Diphyllbothriidea (Bonsdorff a Telkkä 1965; Levron a kol. 2006b). Částečný prstenec z kortikálních mikrotubulů se nachází u druhů *Bothriocephalus claviceps* z řádu Bothriocephalidea a u *Duthiersia fimbriata* z řádu Diphyllbothriidea (Justine 1986; Bâ a kol. 2007).

V zadním konci spermie *Parabothriocephalus gracilis* je přítomno jádro a kortikální mikrotubuly, které se v této části spermie nacházejí také u tasemnice *Paraechinophallus japonicus* z řádu Bothriocephalidea (Levron a kol. 2006a). U tasemnic *Bothriocephalus scorpis* z řádu Bothriocephalidea a *Diphyllobothrium latum* z řádu Diphyllobothriidea se v zadním konci spermie nachází pouze jádro (Bonsdorff a Telkkä 1965; Levron a kol. 2006b,c). Zadní konec spermie postrádá jádro u několika bothriocephalidních zástupců (*Bothriocephalus clavibothrium*, *Eubothrium crassum* a *Triaenophorus nodulosus* – Tabulka 2) a je přítomna pouze axonema. Jádro chybí také u *Ligula intestinalis* (řád Diphyllobothriidea – Levron a kol. nepublikované údaje, Tabulka 2). Zadní konec spermie se proto nejví jako vhodný znak pro diferenciaci řádů Bothriocephalidea a Diphyllobothriidea, jelikož je jeho přítomnost proměnlivá u obou řádů i mezi čeledmi téhož řádu.

6. SOUHRN

Zkoumala jsem ultrastrukturu spermiogeneze a spermií tasemnice *Parabothrioccephalus gracilis* za pomoci transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Popis spermiogeneze byl u zástupce čeledi Echinophallidae proveden poprvé. Zjistila jsem, že u této tasemnice probíhá spermiogeneze typu I, považovaného za nejprimitivnější, což je zajímavé vzhledem k tomu, že zmíněná čeleď patří k fylogeneticky odvozenějším (difosátním) tasemnicím. Zjistila jsem také přítomnost elektrodenzního materiálu v prvních stádiích spermiogeneze. Tento znak vyskytující se v prvních stádiích spermiogeneze je charakteristický pro tasemnice řádů Bothriocephalidea a Diphyllbothriidea, které dříve tvořily skupinu Pseudophyllidea.

Dospělá spermie obsahuje dvě axonemy vzoru 9 + "1". Tento vzor je charakteristický pro všechny zástupce skupiny Neodermata, která patří do taxonu Trepaxonemata. V přední části spermie je přítomno hřebenovité tělísko, které se kromě řádu Bothriocephalidea vyskytuje např. u řádů Diphyllbothriidea, Diphyllidea, Tetraphyllidea, Proteocephalidea, Tetrabothriidea a Cyclophyllidea. U zralé spermie chybí mitochondrie, což je společný znak pro vlastní tasemnice (Eucestoda). Jedním z nejdůležitějších nalezených znaků je přítomnost prstence z kortikálních mikrotubulů, který obklopuje axonemu v předním konci spermie. Tento znak byl zaznamenán pouze u zástupců z řádu Bothriocephalidea a může být jedinečný pro tyto tasemnice.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Bâ C. T., Bâ A., and B. Marchand 2007: Ultrastructure of the spermatozoon of *Bothrioccephalus claviceps* (Cestoda, Pseudophyllidea): a parasite of *Anguilla anguilla* (fish, Teleostei). *Parasitology Research* 101: 77–83.

Bâ C. T., Marchand B. 1995: Spermiogenesis, spermatozoa and phyletic affinities in the Cestoda. In B.G.M. Jamieson, J. Ausiô and J.-L. Justine (Eds.), *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle 166: 87–95.

Bonsdorff C. H. von, Telkkä A. 1965: The spermatozoon flagella in *Diphyllobothrium latum* (fish tapeworm). *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 66: 643–648.

Brabec J., Kuchta R., Scholz T. 2006: Paraphyly of the Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Cestoda): circumscription of monophyletic clades based on phylogenetic analysis of ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology* 36: 1535–1541.

Bray R. A., Jones A., Andersen K. I. 1994: Order Pseudophyllidea Carus, 1863. In L.F. Khalil, A. Jones, and R.A. Bray (Eds.), *Keys to the cestode parasites of vertebrates*. CAB International, Wallingford, U.K., pp. 205–247.

Brooks D. R. 1989: The phylogeny of the cercomeria (Platyhelminthes: Rhabdocoela) and general evolutionary principles. *Journal of Parasitology* 75: 606–616.

Brooks D. R., McLennan D. A. 1993: *Parascript. Parasites and the Language of Evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, 429 pp.

Bruňanská M., Nebesářová J., Scholz T., Fagerholm H.-P. 2001: Spermiogenesis in the pseudophyllidean cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitology Research* 87: 579–588.

Bruňanská M., Nebesářová J., Scholz T., Fagerholm H.-P. 2002: Ultrastructure of the spermatozoon of the pseudophyllidean cestode *Eubothrium crassum* (Bloch, 1779). *Parasitology Research* 88: 285–291.

Bruňanská M., Poddubnaya L. G. 2006: Spermiogenesis in the caryophyllidean cestode *Khawia armeniaca* (Cholodkovski, 1915). *Parasitology Research* 99: 449–454.

Chervy L. 2002: The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic Parasitology* 52: 1–33.

Ehlers U. 1984: Phylogenetisches System der Platyhelminthes. *Verhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (NF)* 27: 291–294.

Ehlers U. 1985: *Das Phylogenetische System der Platyhelminthes*. G. Fischer, Stuttgart, Germany, 317 pp.

Ehlers U. 1986: Comments on a phylogenetic system of the Platyhelminthes. *Hydrobiologia* 132: 1–12.

Hendelberg J. 1962: Paired flagella and nucleus migration in the spermiogenesis of *Dicrocoelium* and *Fasciola* (Digenea, Trematoda). *Zoologiska Bidrag fran Uppsala* 35: 569–587.

Hendelberg J. 1969: On the development of different types of spermatozoa from spermatids with two flagella in the Turbellaria with remarks on the ultrastructure of the flagella. *Zoologiska Bidrag fran Uppsala* 38: 1–50.

Hoberg E. P., Mariaux J., Justine J.-L., Brooks D. R., Weekes P. J. 1997: Phylogeny of the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae) based on comparative morphology: historical perspectives and a new working hypothesis. *Journal of Parasitology* 83: 1128–1147.

Hoberg E. P., Mariaux J., Brooks D. R. 2001: Phylogeny among the orders of the Eucestoda (Cercomeromorphae): integrating morphology, molecules and total evidence. In Littlewood D. T. J., Bray R. A. (Eds.). *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, New York, pp. 112–126.

Justine J.-L. 1986: Ultrastructure of the spermatozoon of the cestode *Duthiersia fimbriata* Diesing, 1854 (Pseudophyllidea, Diphyllbothriidae). *Canadian Journal of Zoology* 64: 1545–1548.

Justine J.-L. 1991: Phylogeny of parasitic Platyhelminthes: a critical study of synapomorphies proposed on the basis of the ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa. *Canadian Journal Zoology* 69: 1421–1440.

Justine J.-L. 1998: Spermatozoa as phylogenetic characters for the Eucestoda. *Journal of Parasitology* 84: 385–408.

Justine J.-L. 2001: Spermatozoa as phylogenetic characters for the Platyhelminthes. In Littlewood D. T. J., Bray R. A. (Eds.). *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, New York, pp. 231–238.

Justine J.-L., Mattei X. 1981: Étude ultrastructurale du flagelle spermatique des schistosomes (Trematoda: Digenea). *Journal of Ultrastructure Research* 76: 89–95.

Justine J.-L., Mattei X. 1982: Réinvestigation de l'ultrastructure du spermatozoïde de *Haematoloechus* (Trematoda: Haematoloechidae). *Journal of Ultrastructure Research* 81: 322–332.

Justine J.-L., Mattei X. 1984: Ultrastructural observations on the spermatozoon, ovocyte and fertilization process in *Gonapodasmius*, a gonochoristic trematode (Trematoda: Digenea: Didymozoidae). *Acta Zoologica* 65: 171–177.

Khalil L. F., Jones A., Bray R. A. (Eds.) 1994: *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. CAB International, Wallingford, 751 pp.

Kuchta R., Scholz T., Brabec J., Bray R. A. 2008: Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Eucestoda) and proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea. *International Journal for Parasitology* 38: 49–55.

Kuchta R., Scholz T., Bray R.A. 2009: Revision of the order Bothriocephalidea Kuchta, Scholz, Brabec & Bray, 2008 (Eucestoda) with amended generic diagnoses and keys to families and genera. *Systematic Parasitology* (in press).

Levron C., Bruňanská M., Marchand B. 2005: Spermiogenesis and sperm ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781). *Parasitology Research* 98: 26–33.

Levron C., Sitko J., Scholz T.: Spermiogenesis and spermatozoon of the tapeworm *Ligula intestinalis* (Diphyllbothriidea): phylogenetic implications. *Journal of Parasitology* (submitted).

Levron C., Bruňanská M., Kuchta R., Freeman M., Scholz T. 2006a: Spermatozoon ultrastructure of the pseudophyllidean cestode *Paraechinophallus japonicus*, a parasite of deep-sea fish *Psenopsis anomala* (Perciformes, Centrolophidae). *Parasitology Research* 100: 115–121.

Levron C., Bruňanská M., Poddubnaya L. G. 2006b: Spermatological characters in *Diphyllbothrium latum* (Cestoda, Pseudophyllidea). *Journal of Morphology* 267: 1110–1119.

Levron C., Bruňanská M., Poddubnaya L. G. 2006c: Spermatological characters of the pseudophyllidean cestode *Bothriocephalus scorpii* (Müller, 1776). *Parasitology International* 55: 113–120.

MacKinnon B. M., Burt M. D. B. 1985: Ultrastructure of spermatogenesis and the mature spermatozoon of *Haplobothrium globuliforme* Cooper, 1914 (Cestoda: Haplobothrioidea). *Canadian Journal of Zoology* 63: 1478–1487.

Miquel J., Świdorski Z., Neifar L., Eira C. 2007: Ultrastructure of the spermatozoon of *Parachristianella trygonis* Dollfus, 1946 (Trypanorhyncha: Eutetrarhynchidae). *Journal of Parasitology* 93: 1296–1302.

Mollaret I., Justine J.-L. 1997: Immunocytochemical study of tubulin in the 9 + 1 sperm axoneme of a monogenean (Platyhelminthes), *Pseudodactylogyrus* sp. *Tissue and Cell* 29: 699–706.

Müller R. 2002: *Worms and Human Disease*. Second Edition. CABI Publishing, Wallingford, 300 pp.

Olson P. D., Littlewood D. T. J., Bray R. A., Mariaux J. 2001: Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 443–467.

- Reynolds E. S. 1963:** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208–212.
- Roberts L. S., Janovy J. Jr. 2005:** Seventh Edition, *Foundations of Parasitology*, Schmidt G. D. and Roberts L. S. (Eds.). McGraw Hill Companies, Inc., Boston, USA, 702 pp.
- Rohde K. 1994:** The origins of parasitism in the Platyhelminthes. *International Journal for Parasitology* 24: 1099–1115.
- Schumacher G. 1914:** Cestoden aus *Centrolophus pompilus* (L.). *Zoologischer Jahrbücher, Abtheilung für Systematik* 36: 149–198.
- Sedlák, E. 2005:** *Zoologie bezobratlých, 2. přepracované vydání* Brno, Masarykova univerzita, 336 pp.
- Smyth J. D., MacManus D. P. 1989:** *The Physiology and Biochemistry of Cestodes*. Cambridge University Press, Cambridge, 398 pp.
- Świdorski Z., Mackiewicz J. S. 2002:** Ultrastructure of spermatogenesis and spermatozoa of the caryophyllidean cestode *Glaridacris catostomi* Cooper, 1920. *Acta Parasitologica* 47: 83–104.
- Świdorski Z., Mokhtar–Maamouri F. 1980:** Etude de la spermatogénèse de *Bothriocephalus clavibothrium* Ariola, 1899 (Cestoda: Pseudophyllidea). *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis* 57: 323–357.
- Thiéry J.-P. 1967:** Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal of Microscopy* 6: 987–1018.
- Volf P., Horák P. (Eds.) 2007:** *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha, 318 pp.
- Wang Yan-Hai, Liu Sheng-Fa, Yang Yu-Rong 2004:** *Parabothriocephalus psenopsis* n. sp. (Eucestoda: Pseudophyllidea) in *Psenopsis anomala* from Taiwan Strait, China. *Journal of Parasitology* 90: 623–625.
- Yamaguti S. 1934:** Studies on the helminth fauna of Japan IV. Cestodes of fishes. *Japan Journal of Zoology* 6: 1–112.
- Zrzavý J. 2006:** *Fylogeneze živočišné říše*. Scientia, Praha, 256 pp.