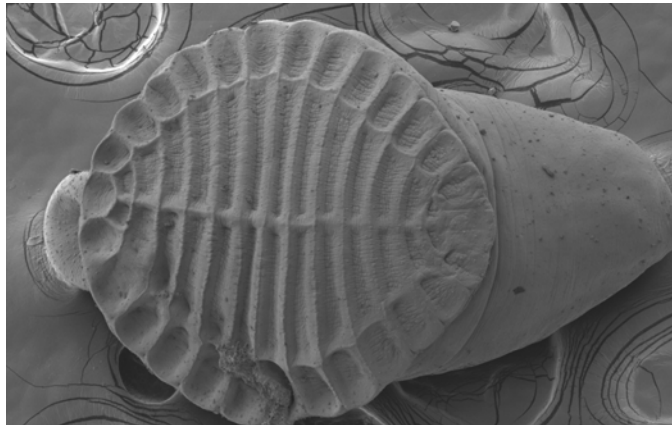


Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích
Katedra parazitologie

Bakalářská práce



**Ultrastruktura spermiogeneze a spermie motolice
Aspidogaster limacoides (Trematoda, Aspidogastrea)**



Eva SUCHANOVÁ

Vedoucí práce: Céline Levron PhD.

Duben 2008

Bakalářská práce

Suchanová Eva 2008: Ultrastruktura spermiogeneze a spermie motolice *Aspidogaster limacoides* (Trematoda, Aspidogastrea). Bakalářská práce [Ultrastructure of the spermiogenesis and spermatozoon of the trematode *Aspidogaster limacoides* (Trematoda, Aspidogastrea). Bc. Thesis in Czech] – 26 p., University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Spermiogenesis and ultrastructural organization of the spermatozoon of *Aspidogaster limacoides* (Trematoda, Aspidogastrea) were examined using transmission electron microscopy (TEM). Spermiogenesis is characterized by a proximo-distal fusion of the two flagella with the median cytoplasmic process. The mature spermatozoon possesses several regions with different ultrastructural characters. A long undulating membrane present in the anterior part of the spermatozoon of *A. limacoides* may be a characteristic typical of aspidogastreans.

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 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, 30.4.2008

.....
Eva Suchanová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi pomohli s vypracováním mé práce. Zejména mé školitelce Céline Levron za čas a trpělivost, které mi věnovala po celou dobu mé práce. Dále děkuji Janě Nebesářové a technikům Laboratoře elektronové mikroskopie za pomoc při práci s transmisním elektronovým mikroskopem. Děkuji Tomáši Scholzovi za čas, který mi věnoval, Mikuláši Orosovi a Romanu Kuchtovi za poskytnutí materiálu pro moji práci.

Obsah

1. Úvod a literární přehled	1
1.1. Kmen Platyhelminthes	1
1.2. Trematoda – motolice.....	1
1.3.1. Morfologie.....	3
1.3.2. Vývoj.....	4
1.3.3. Systematické postavení	4
1.4. <i>Aspidogaster limacoides</i> Diesing, 1835	6
1.5. Spermioogeneze a stavba spermie plathelminťů (Platyhelminthes).....	7
1.5.1. Trepaxonemata	7
1.5.2. Spermioogeneze a struktura spermií u <i>Aspidogastrea</i>	8
2. Cíle práce	9
3. Materiál a metody	10
3.1. Materiál	10
3.2. Metody	10
3.2.1. Příprava materiálu	10
3.2.2. Krájení a kontrastování vzorku	10
4. Výsledky	11
4.1. Spermioogeneze	11
4.2. Ultrastruktura spermie.....	11
5. Diskuse	18
6. Závěr	22
7. Použitá literatura	23

1. Úvod a literární přehled

1.1. Kmen Platyhelminthes

Skupina zahrnuje volně žijící komensály, ale i velký počet parazitických skupin, z nichž naprostá většina patří do skupiny Neodermata. Hlavním charakteristickým znakem je dorso-ventrálně zploštělé tělo, které je bilaterálně symetrické. Epidermis je u volně žijících druhů tvořena řasinkovým epitelem z mnohobíčíkatých buněk. Parazitičtí zástupci (Neodermata) vytvářejí pokožkový syncytiální epitel zvaný neodermis, nebo tegument (Smyth a Halton 1983).

Pohyb ploštěnců je umožněn díky kožně-svalovému vaku, který je tvořen vrstvou okružních, podélných a šikmých svalových vláken, která jsou uložena přímo pod tegumentem (Smyth a Halton 1983). Ploštěnci dýchají celým povrchem těla a transport živin probíhá zejména difúzí v mesenchymu. Trávicí soustava je trubicovitého typu a je rozdělena na přední část (foregut) a párová střeva (intestinal caeca) (Smyth a Halton 1983).

Vylučovacími orgány jsou párovitá protonefridia, která jsou tvořena spojením plaménkové a kanálkové buňky (Smyth a Halton 1983). Ploštěnci jsou nejprimitivnější skupinou živočichů, u kterých nalezneme centrální nervovou soustavu. Ta je tvořena jedním párem cerebrálních ganglií s příčnou spojkou. Z ganglií vybíhá několik podélných párů nervových pruhů, ze kterých je jeden pár dominantní (Reuter a Halton 2000).

Neodermata jsou nejodvozenější skupinou ploštěnců a její zástupci jsou výhradně parazitičtí. Její název je odvozen podle toho, že v průběhu ontogeneze dochází ke tvorbě nového tělního pokryvu nazvaného tegument nebo neodermis (Ehlers 1985). Tegument tvoří syncytiální povrchový útvar, na jehož povrchu nejsou vytvořeny cilie, ale má nápadný glykokalyx, což je filamentózní struktura produkovaná tegumentem a slouží jako ochrana proti obranným faktorům hostitele (Smyth a Halton 1983).

1.2. Trematoda – motolice

Skupina Neodermata sestává ze tří skupin (tříd): Trematoda, Cestoda a Monogenea. Třída Trematoda (motolice) zahrnuje výhradně endoparazity, včetně zástupců podtřídy Aspidogastrea, které nacházíme ve střevě ryb a v perikardiu měkkýšů. Dobře vyvinutý trávicí systém začíná ústním otvorem, který u většiny motolic leží v dutině ústní přísavky. Následuje předhltan (*prepharynx*), svalnatý hltan (*pharynx*) a jícen (*oesophagus*). Potravu tvoří většinou

střevní obsah, krev nebo tkáňová tekutina (Smyth a Halton 1983). K příjmu živin dochází pomocí epitelu trávicí soustavy (*gastrodermis*) (Volf a Horák 2007).

Přichycovací orgány jsou tvořeny většinou dvěma přísavkami, u zástupců podtřídy Aspidogastrea jich může být velký počet. Dobře je vyvinuta zejména břišní přísavka (acetabulum), která plní funkci hlavního fixačního orgánu. Na fixaci se mohou podílet také povrchové struktury, například tegumentární trny. Motolice většinou nemají vytvořeny speciální sklerotizované struktury podílející se na přichycení v hostiteli, některé skupiny však mají přídatné struktury ve formě tegumentárních trnů nebo ostnů, které se nacházejí hlavně kolem ústní přísavky (Acanthostomidae, Echinostomatidae) (Rohde 2002).

Samčí pohlavní soustava je tvořena varlaty (testes), kterých může být rozdílný počet (jedno, většinou dvě, případně více). Spermie jsou odváděny tenkými kanálky (*vasa efferentia*), postupně se spojujícími v nepárový chámovod (*vas deferens*), který následně přechází do terminální části tvořené váčkovitým útvarem – cirovým vakem. V cirovém vaku se rozšiřuje v semenný váček (*vesicula seminalis interna*), kde se hromadí spermie před kopulací. Spermie pak odcházejí při kopulaci trubicí (*ductus ejaculatorius*), která je většinou součástí svalnatého ciru. Cirus může u motolic úplně chybět a jeho funkci nahrazují přídatné, svalnaté nebo žláznaté orgány, např. gonotyl u čeledi Heterophyidae (Horák a Scholz 1998).

Samičí soustavu tvoří vaječník (*ovarium*), který je téměř vždy nepárový. Z něho jsou uvolňovány oocyty do ookaptu a dále do oviductu, do kterého ústí Laurerův kanál, jenž patrně nahrazuje u motolic vaginu přítomnou u tasemnic a monogeneí. V blízkosti vaječníku je tenkostěnný semenný rezervoár (*receptaculum seminis*). Vajíčka jsou formována v ootypu trubicovitého nebo oválného tvaru, do kterého vyústí vývody žlutkových trsů (*vitellarium*) a četných žlázek různého tvaru a obsahu (Mehlisovy žlázy). Vajíčka zformovaná v ootypu postupně dozrávají v trubicovité děloze (*uterus*). Trematoda mají dělohu tenkostěnnou, trubicovitou, s četnými kličkami. Děloha je v terminální (distální) části často silnostěnná a tvoří tzv. metraterm, který vyústí společně se samčím vývodem genitálním pórem nebo do genitálního atria (Smyth a Halton 1983).

Jedinci této třídy mají složité vývojové cykly s účastí nejméně jednoho mezihostitele, kterým je téměř vždy měkkýš (Mollusca). V něm dochází k asexuálnímu množení, zatímco pohlavní množení je omezeno na definitivního hostitele, obvykle obratlovci. Základní vývojové fáze motolic jsou vajíčko – miracidium – sporocysta – redie – cercárie – metacercárie – dospělec. Do svých hostitelů se motolice dostávají aktivně penetrací nebo pasivně, především pozřením (perorálně). Aktivně proniká miracidium do měkkýše nebo cercárie do definitivního hostitele (*Schistosoma*) (Cribb a kol. 2003).

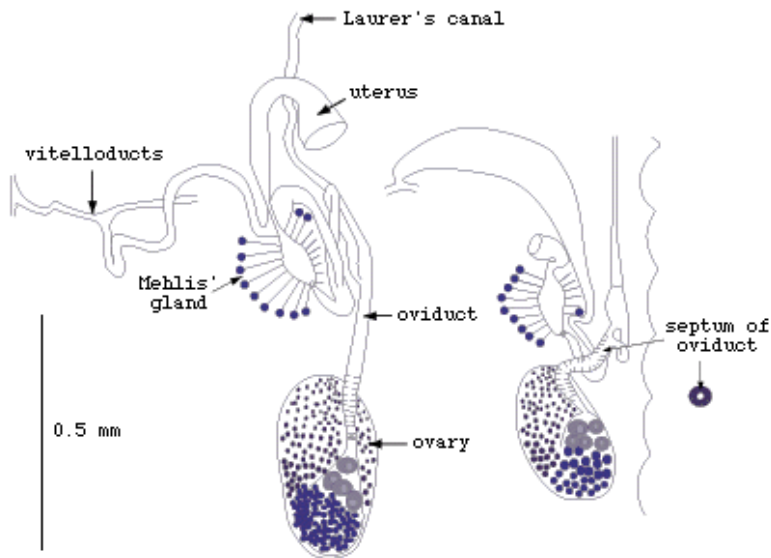
1.3. Podtřída Aspidogastrea

Podtřída představuje malou skupinu kosmopolitně rozšířených, evolučně patrně bazálních motolic (Trematoda), které mají parazitický vztah s měkkýši. Někteří zástupci jsou však pravděpodobně pouze fakultativní paraziti ryb a mořských želv, neboť dokáží přežít delší dobu v primitivních podmínkách (voda, fyziologický roztok) (Fredericksen 1978).

Zástupci podtřídy Aspidogastrea nejsou lékařsky ani ekonomicky významní. Jsou však biologicky a evolučně důležití, protože zřejmě představují mezičlánek mezi volně žijícími a parazitickými zástupci ploštěnců (Platyhelminthes) (Rohde 1973).

1.3.1. Morfologie

Zástupci čeledi Aspidogastridae mají velkou ventrální přísavku překrývající většinu jejich těla. Přísavka označovaná jako Baerův disk má svalnaté přepážky v podélných i příčných řadách, které se zanořují dovnitř mělkých prohlubenin (alveoly nebo loculy). Háčky nebo jiné sklerotizované struktury nejsou vyvinuty (Ip a kol. 1982).



Obr. 1. Samičí reprodukční orgány *Multicotyle purvisi*. Převzato z Rohde (1972).

Axiální (longitudinální) přepážka je typická morfologická charakteristika skupiny Aspidogastrea. Tvoří vodorovnou vrstvu spojující tkáň a svaly v přední části těla a zanořuje se do těla v dorzálním a ventrálním úseku. Funkce této přepážky není známa, ale pravděpodobně hraje roli při stlačování velké ventrální přísavky (Ip a kol. 1982).

Povrch těla tvoří syncytiální epidermis, která má vnější vrstvu distální cytoplasmy. Obsahuje mitochondrie a měchýřky různých typů. Povrchová jádra jsou uvnitř nervových buněk v povrchové vrstvě svalů a spojují se s distální cytoplasmou, která obsahuje smyslové

orgány. Velké množství nervových jader je umístěno v Golgiho komplexech. Slizová vrstva se tvoří na povrchu těla (Ip a Desser 1984).

Zástupci skupiny jsou hermafroditi. Základem pohlavního systému jsou varlata a vaječník. Varle je umístěno pod vaječníkem, může být jedno, dvě nebo více. Chámovod je v koncové části zvětšený do podoby semenného váčku. Círový vak vyúsťuje genitálním pórem do společného genitálního atria (Ip a Desser 1984, Watson a Rohde 1995). Vaječník může být laločnatý nebo hladký (Rohde 1972). Vajíčka putují do vejcovodu a dále postupují do ootypu, který je obklopen buňkami Mehlisovy žlázy. Z ootypu vychází Laurerův kanál, který končí slepě v parenchymu nebo může být spojen s vylučovacím kanálem. Laurerův kanál mohl v průběhu evoluce motolic nahradit vaginu přítomnou u tasemnic. Silná svalovina terminálního (distálního) konce dělohy zvaná metraterm slouží k usnadnění uvolnění vajec ven z pohlavních cest (Rohde 1973).

1.3.2. Vývoj

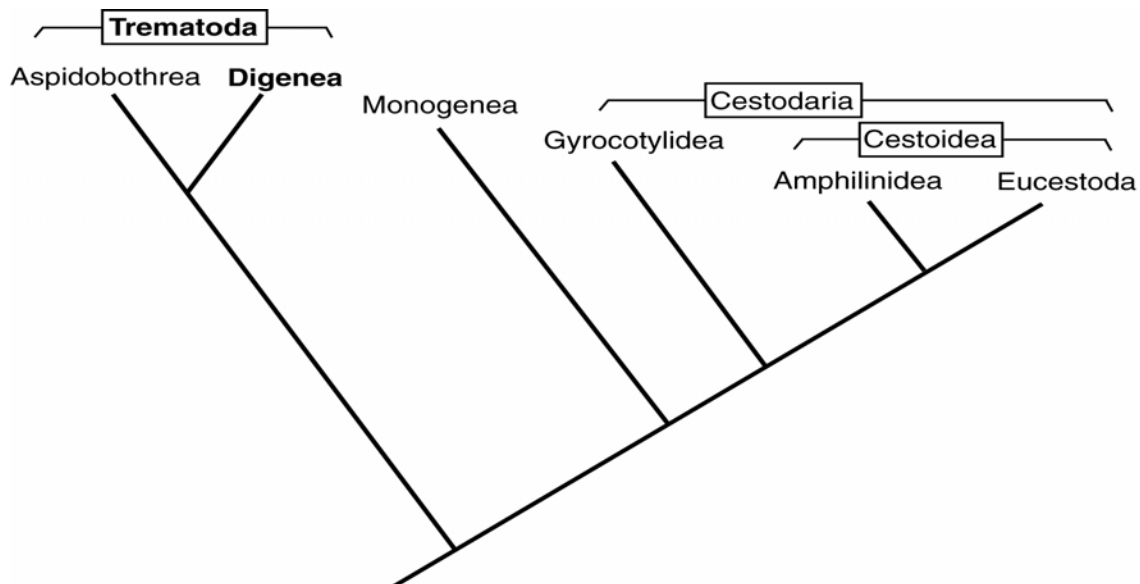
Aspidogastrea mají samostatný žloutek a jejich vajíčka jsou ektolecitální (velká část zárodečného žloutku je tvořena buňkami, které obalují zygotu uvnitř zárodečného obalu). Larva (kotylocidium) se líhne z vajíčka. U mnoha druhů je její povrch pokryt trsy řasinek, které slouží k plavání. Larvy mají ústa, hltan, jednoduché střevo a dobře vyvinutý ventrální disk bez alveol. Během vývoje v hostiteli se formují alveoly v přední části ventrálního disku (Fredericksen 1978).

Zástupci podtřídy Aspidogastrea mají rozmanité životní cykly. Zástupci parazitující v obratlovcích vyžadují patrně vždy mezihostitele, neboť není znám případ, kdy by volná larva nakazila přímo obratlovce. Někdy může být živočich odstraněn z definitivního hostitele a může přežít i několik dní ve vodě nebo ve fyziologickém roztoku. Pokud dojde k pozření definitivního hostitele, motolice jsou schopny přežít i v novém hostiteli. Není proto neobvyklé nalézt zástupce Aspidogastrea v zaživacím traktu ryb, ačkoliv normálně parazitují u měkkýšů (Fredericksen 1978). Někteří zástupci nedospívají v měkkýši, ale potřebují rybu jako definitivního hostitele (Hendrix a Overstreet 1977). Druh *Lobatostoma manteri* dospívá v různých druzích měkkýšů, ale pro dosažení vývoje musí projít zaživacím traktem ryby (*Trachinotus blochi*), která se živí měkkýši (Rohde 1973, 1975).

1.3.3. Systematické postavení

Podtřída Aspidogastrea byla dříve uvedena pod názvy Aspidobothrii Burmeister, 1856 a Aspidobothria Monticelli, 1888. Třída Aspidocotylea byla navržena Monticellim (1892).

Faust a Tang (1936) navrhli jméno *Aspidogastrea*, které je dnes nejvíce používáno (Rohde 2002). Dollfus (1958) poprvé zařadil skupinu *Aspidogastrea* jako podtřídu Trematoda. Yamaguti (1936) publikoval přehled všech rodů i druhů skupiny a Gibson a Chinabut (1984) navrhli novou klasifikaci této podtřídy. První skupina (řád) *Aspidogastrida* zahrnuje jedinou čeleď *Aspidogastridae* s podčeledmi *Aspidogastrinae*, *Cotylaspidinae* a *Rohdellinae*. Druhá skupina (řád) *Stichocotylida* se skládá z čeledí *Stichocotylidae*, *Multicalycidae* a *Rugogastridae*. Nejrozsáhlejší přehled celé skupiny, včetně informací o nových taxonech, hostitelské specificitě, zeměpisném rozšíření, životních cyklech a fylogenezi obsahují práce Rohdeho (1972, 1994).



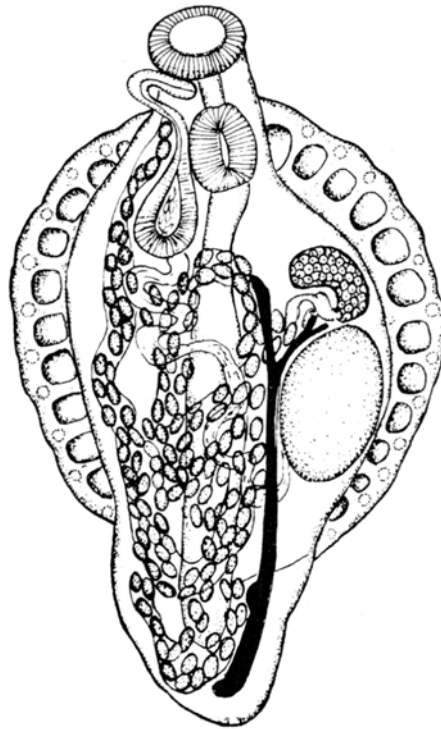
Obr. 2. Systematické postavení hlavních skupin parazitických plathelminů. Podle Justine (1997).

Ohledně evoluce skupiny a jejího postavení mezi parazitickými ploštenci (Neodermata) panovaly různé názory, jelikož *Aspidogastrea* mají shodné znaky s různými skupinami. Anatomicky jsou bližší motolicím (*Digenea*), ale jejich způsob života (vývojový cyklus) připomíná spíše *Monogenea*. Studium morfolgie a DNA bylo prokázáno, že *Aspidogastrea* jsou sesterská skupina *Digenea* (Littlewood a kol. 1999, Litvaitis a Rohde 1999; obr. 2).

Převaha měkkýšů jako definitivních hostitelů a dobře rozvinutý nervový systém jsou znaky sdílené se zástupci podtřídy *Digenea*. Dalšími společnými znaky pro *Aspidogastrea* a *Digenea* jsou přítomnost Laurerova kanálu a ventrální přísavky (Blair 1993).

1.4. *Aspidogaster limacoides* Diesing, 1835

Motolice *Aspidogaster limacoides* (čelěd Aspidogastridae) byla poprvé popsána Diesingem (1835), který ale neuvedl místo nálezu. Další záznamy o rozšíření pochází od Bykhovské-Pavlovské a kol. (1962), Evlanovy (1990) a Nagibiny a Timofeevy (1971), kteří



Obr. 3. *Aspidogaster limacoides* Diesing, 1835. Podle Bykhovsky a Bykhovskaya (1934).

druh našli v měkkýších a rybách v Ponto-Kaspické oblasti. Další nálezy pocházejí z měkkýšů rodu *Cardium* a *Adanca* z Kaspického moře, mlžů rodů *Pisidium*, *Sphaerium* a *Dreissena* z volgogradské nádrže v Rusku. V této nádrži byl druh nalezen také u kaprovitých ryb (*Blicca bjoerkna*, *Abramis brama*, *A. sapa* a *Rutilus rutilus* – Nagibina a Timofeeva 1971). Byl rovněž nalezen v sumcovi (*Silurus glanis*) a kaprovitých a hlaváčovitých rybách v povodí Černého, Kaspického a Azovského moře. V Rybinské nádrži v Rusku byl nalezen v několika kaprovitých rybách včetně jelce jesena (*Leuciscus idus*) (Zhokhov 2001).

Tento druh cizopasí v ledvinách, v osrdečníku a v ledvinové dutině mlžů, ale také ve střevě kaprovitých ryb. U *Dreissena polymorpha* byl nalezen na ventrálním povrchu útrobního vaku a uvnitř gonád.

Jeho tělo dorůstá délky 0,5–4,0 mm a šířky 0,4–1,5 mm. Tělo je široce oválné a zúžené v přední a zadní části. Typickým znakem je ventrální přísavný orgán, který má podobu velkého oválného vypouklého disku. Tento přísavný disk zvaný Baerův disk tvoří dvě vnitřní

řady, které jsou složeny z 12 až 18 prohlubní (*lokuly*), a pět postranních řad s méně než 72 prohlubněmi. Terminální ústní otvor postrádá přísavku, ale je obklopen hltanem. Dlouhý jícen pokračuje dál do těla dlouhým vakovitým střevem (Bykhovskaya-Pavlovskaya a kol. 1962).

Samčí pohlavní orgány tvoří nepárové varle, chámovod a semenný váček s cirem uzavřené v hruškovitém cirovém vaku. Prostatické žlázy obklopují proximální (bazální) část cirového vaku. Genitální pór je umístěn na úrovni předního konce přísavného orgánu (Baerova disku). Vaječník může být uložen šikmo. Kličky trubicovité dělohy vyplňují většinu těla. Metraterm je dobře odlišený od ostatních částí dělohy. Laurerův kanál je vytvořen, ale většinou je zakončen slepě, případně může být otevřen do nálevky v zadní dutině těla. Vitelarium je trubicovité nebo váčkovité a nachází se na obou krajích střeva (laterálně). Začíná v přední části těla a může v zadní části ústit do tělní dutiny (Faust a Tang 1936). Vajíčka jsou nahnědlé barvy a mají rozměry 60–100 μm \times 30–40 μm (Bykhovskaya-Pavlovskaya a kol. 1962).

1.5. Spermioogeneze a stavba spermie plathelminťů (Platyhelminthes)

Spermie plathelminťů obsahují velmi rozmanité struktury zahrnující aflagelátní, uni-flagelátní a biflagelátní buňky. Všichni zástupci kmene Platyhelminthes mají vnitřní oplodnění a spermie jsou zpravidla dlouhé, nitkovité (filiformní) buňky. Spermioogeneze u parazitických plathelminťů probíhá v mnoha skupinách (Monogenea – Polyopisthocotylea, Digenea, Aspidogastrea, Gyrocotylidea, Amphilinidea, Eucestoda) podle stejného vzoru a s velmi charakteristickou strukturou spermii (Justine 1991a, 1995). Spermatidy se shlukují ve skupinách 32–64 buněk. Každá spermatida vytváří zónu, ve které se následně tvoří střední cytoplasmatický výběžek a dva postranní bičíky (Justine 1998). Později během spermioogeneze tyto části splývají a tvoří se zralá spermie, která má dvě axonemy začleněné v cytoplasmě spermie. Tento proces začleňování axonem do rozvíjející se buňky se nazývá proximodistální fúze (Justine 1991b), neboť splnutí začíná v proximální a končí v distální oblasti cytoplasmy spermie. Volné bičíky jsou viditelné na konci spermie jako dlouhé výběžky. Axonemy jsou celé začleněné do zralé spermie. Tuto strukturu nalezneme u mnoha Digenea a také u Aspidogastrea (Justine 1991c, 1995).

1.5.1. Trepaxonemata

Toto jméno označuje taxon se stejnou stavbou spermie, které mají charakteristické uspořádání: 9 + '1' axonem. Trepaxonemata se vyznačují spiralizovanou strukturou centrálního válce, který je viditelný v podélném řezu. V příčném řezu má válec tvar elektron-

densního prstence o průměru okolo 70 nm (Henley a kol. 1969, Silveira 1975). Číslo jedna označuje samostatnou strukturu, která není tvořena mikrotubuly, číslo devět odkazuje na přítomnost devíti dvojic ve vnějším kruhu (Justine a Mattei 1981). Skutečná 9 + 1 struktura s devíti vnějšími dvojicemi mikrotubulů a samostatnými centrálními mikrotubuly existuje ve vzácných případech, ale nenachází se u Trepaxonemata.

Opakem výše uvedené stavby je mnoho axonem spermií z živočichů, ve kterých převažuje uspořádání 9 + 2, kde číslo dvě ukazuje na přítomnost dvou množin mikrotubulů uprostřed, zatímco číslo 9 znamená počet dvojic mikrotubulů ve vnějším kruhu (Justine a Mattei 1981). Spermie všech eukaryot, včetně trepaxonemat, obsahují tubulin (Duvaux-Miret a kol. 1991).

Struktura centrálního jádra trepaxonemat je podložena zkoumáním jeho ultrastruktury (Shapiro a kol. 1961, Henley a kol. 1969, Silveira 1969, 1975). Současné imunocytochemické studie pomocí elektronového mikroskopu používají protilátky proti tubulinu a tyto metody dokazují, že centrální jádro neobsahuje tubulin (Justine 2001).

Některé druhy motolic čeledi Didymozoidae mají axonemy spermií složené z devíti dvojic okolo prázdného centra (vzor 9 + 0 – Justine a Mattei 1983, 1984). Schistosomy mají devět dvojic okolo neurčitě zhuštěného jádra (Justine 1995).

1.5.2. Spermioogeneze a struktura spermií u *Aspidogastrea*

Spermioogeneze a struktura spermie byly u *Aspidogastrea* poprvé studovány u druhu *Multicotyle purvisi* Dawes, 1941 (Watson a Rohde 1991). Spermie se vyvíjejí jako shluky jader obklopujících centrální hmotu cytoplasmy – *cytofor*. Dva bičíky s žíhanými kořeny (*striated rootlets*) rotují v místě jejich základu do pravého úhlu. Po dokončení rotace jsou bičíky umístěny kolmo k intercentriolárnímu tělísku (*intercentriolar body*). Mezi bičíky vyrůstá střední cytoplasmatický výběžek (*median cytoplasmatic process*). Jádro a mitochondrie migrují do středního cytoplasmatického výběžku, zatímco bičíky se i nadále ohýbají na jejich počátcích. V další fázi vývoje už leží souběžně se středním cytoplasmatickým výběžkem a někdy s ním mohou i splývat. Tento proces je známý pod názvem proximodistální fúze (Justine 1995, Watson a Rohde 1995).

Zralá spermie obsahuje dvě axonemy rozdílné délky v uspořádání devět plus jedna, což je typické pro celou skupinu Trepaxonemata. Dále obsahuje jádro, mitochondrie, kortikální mikrotubuly a elektrondensní granule. Od předního po zadní konec spermie je možné rozlišit pět oblastí s rozdílnou ultrastrukturální charakteristikou. Stavba spermie byla u podtřídy *Aspidogastrea* zatím studována pouze u zástupců uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled zástupců podtřídy Aspidogastrea s údaji o spermiogenezi a ultrastruktuře spermií.

Legenda: + – provedena studie, - – doposud chybějící údaje.

Zástupce	spermiogeneze	spermie	Autor popisu
<i>Aspidogaster conchicola</i>	-	+	Bakker a Diegenbach 1973
<i>Lobatostoma manteri</i>	+	+	Rohde a kol. 1991
<i>Multicotyle purvisi</i>	+	+	Watson a Rohde 1991
<i>Rugogaster hydrolagi</i>	+	+	Watson a Rohde 1992

Doposud bylo zjištěno, že spermiogeneze a stavba spermie u druhu *Rugogaster hydrolagi* jsou identické s motolicemi (Digenea) (Watson a Rohde 1992).

Studium ultrastruktury u Aspidogastrea je prozatím na okraji zájmu v porovnáním se studiem anatomie a biologie, které byly hojně studovány zejména u druhů *Multicotyle purvisi* Dawes, 1941 a *Lobatostoma manteri* Rohde, 1973.

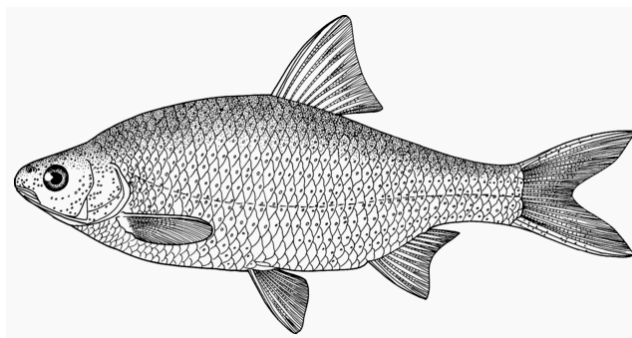
2. Cíle práce

1. Literární rešerše údajů o spermiogenezi a ultrastruktuře spermií u skupiny Aspidogastrea.
2. Studium a charakteristika ultrastruktury spermiogeneze a spermie druhu *Aspidogaster limacoides*.
3. Porovnání zjištěných údajů s informacemi o ostatních zástupcích skupiny.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Celkem tři jedinci druhu *Aspidogaster limacoides* byli získáni ze střeva plotice obecné *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758), z řeky Tisy (východní Slovensko – Malé Trakany). Na pitvání ryb se podíleli Céline Levron, Roman Kuchta a Mikuláš Oros, pracovník Parazitologického ústavu SAV v Košicích. Vzorky byly získány v červnu roku 2006.



Obr. 4. *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758)

3.2. Metody

3.2.1. Příprava materiálu

Jelikož je *A. limacoides* živočich velmi malých rozměrů, nemusel být před fixací rozřezán na menší části. Vzorky byly fixovány v 2,5 % glutaraldehydu v kakodylátovém pufru po dobu 10 dní při teplotě 4°C. Dalším krokem bylo proplachování v 0,1 M sodném kakodylátovém pufru o pH 7,2. Postfixace byla provedena v roztoku chladného (4°C) 1% OsO₄ v kakodylátovém pufru po dobu 1 hodiny. Vzorky byly následně dehydratovány ve směsi etanolu a propylenoxidu. Dehydratace byla provedena vzestupnou řadou etanolu (vzorek je umístěn do roztoků o stoupajících koncentracích 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%). Takto upravené vzorky byly vloženy do silikonových forem s otvory ve tvaru bločku a zality směsí pryskyřic Epon a Araldit. Vzorky byly v pryskyřici orientovány co nejblíže řezné rovině bločku.

3.2.2. Krájení a kontrastování vzorku

Ultratenké řezy (tloušťka 60–90 nm) byly nakrájeny pomocí ultramikrotomu Leica Ultracut UCT. Řezy byly umístěny na měděnou síťku opatřenou tenkou blankou, která slouží k podepření řezu. Dále byly řezy obarveny uranylacetátem a citrátem olova podle Reynoldse (1963). Po barvení byla přebytečná barva omyta destilovanou vodou, aby nedošlo ke znečištění mikroskopu a jeho součástí.

Ultratenké řezy byly prohlíženy transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1010 s urychlovacím napětím 80 kV v laboratoři elektronové mikroskopie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR.

4. Výsledky

4.1. Spermioogeneze

Spermatida je v rané fázi vývoje tvořena velkým kruhovým jádrem, kolem kterého jsou přítomny četné mitochondrie (obr. 5). Zóna utváření je charakteristická přítomností intercentriolárního tělíska (*intercentriolar body*), které je od bičíků odděleno dvěma centriolami (obr. 5). Intercentriolární tělísko je složeno ze šesti elektrondensních vrstev oddělených pěti elektronlucentními vrstvami. Bičíky jsou připojeny pomocí centriol a svírají v této fázi vývoje pravý úhel s intercentriolárním tělískem. Tyto tři části (intercentriolární tělísko, bičíky a centriola) jsou umístěny v zóně utváření, ohraničené membránou. V další fázi dochází k rotaci bičíku (obr. 6). Bičíky rotují kolmo k intercentriolárnímu tělísku a současně je formován střední cytoplasmatický výběžek (obr. 7).

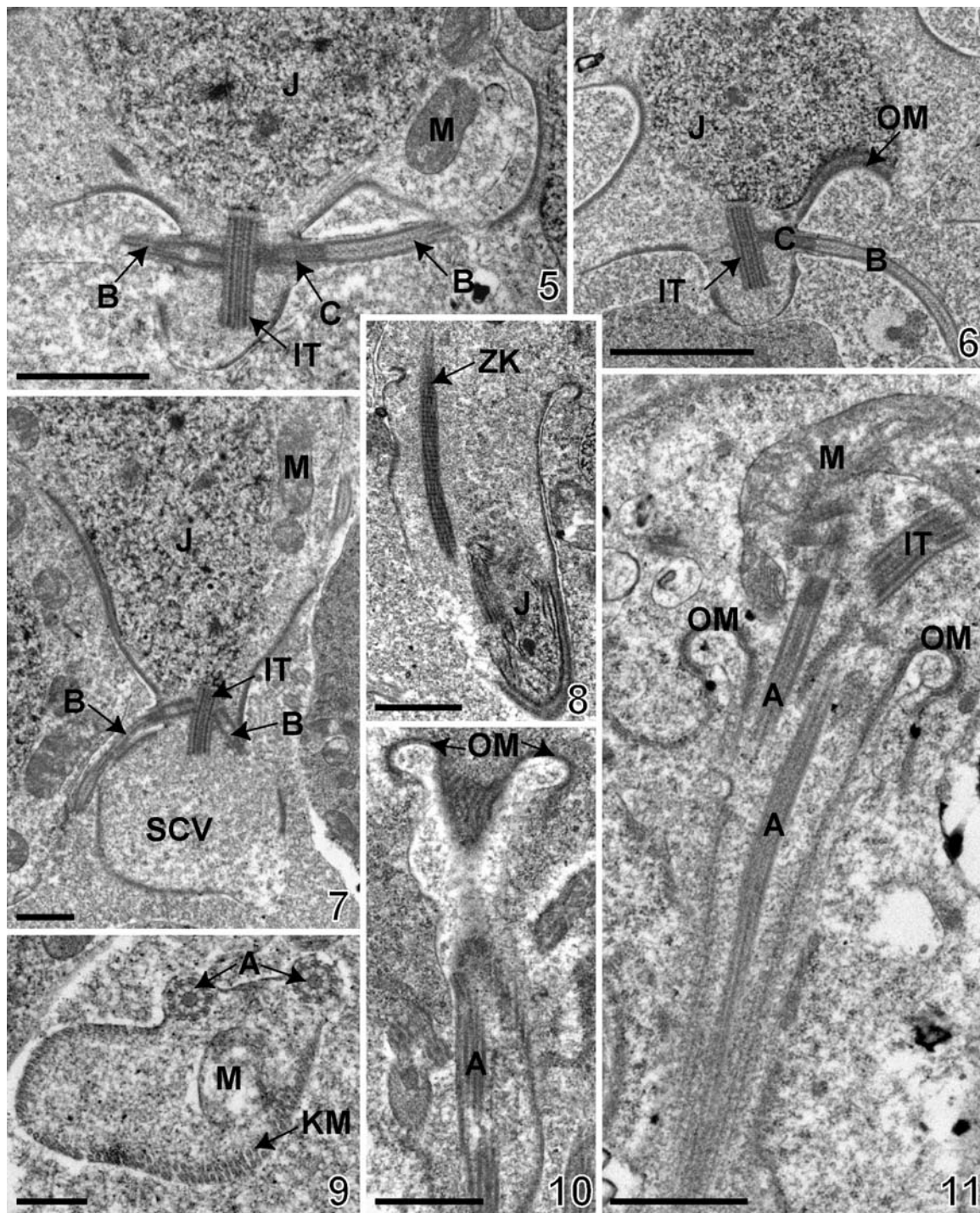
Žíhané kořeny (*striated rootlets* – podlouhlá struktura tvořená odlišnými elektrondensními vrstvami) (obr. 8) vznikají v blízkosti jádra a zóny formování. Intercentriolární tělísko je stále částečně viditelné. Jaderný chromatin kondenzuje a jádro se začíná objevovat v prodloužené zóně utváření (obr. 8).

Mitochondrie splývají a tvoří jednu prodlouženou mitochondrii, která poté migruje do středního cytoplasmatického výběžku, jehož střední částí prostupují axonemy a současně probíhá proximodistální fúze (obr. 11). Spermie je oddělena od zbývající cytoplasmy v místě ohraničující membrány (obr. 10).

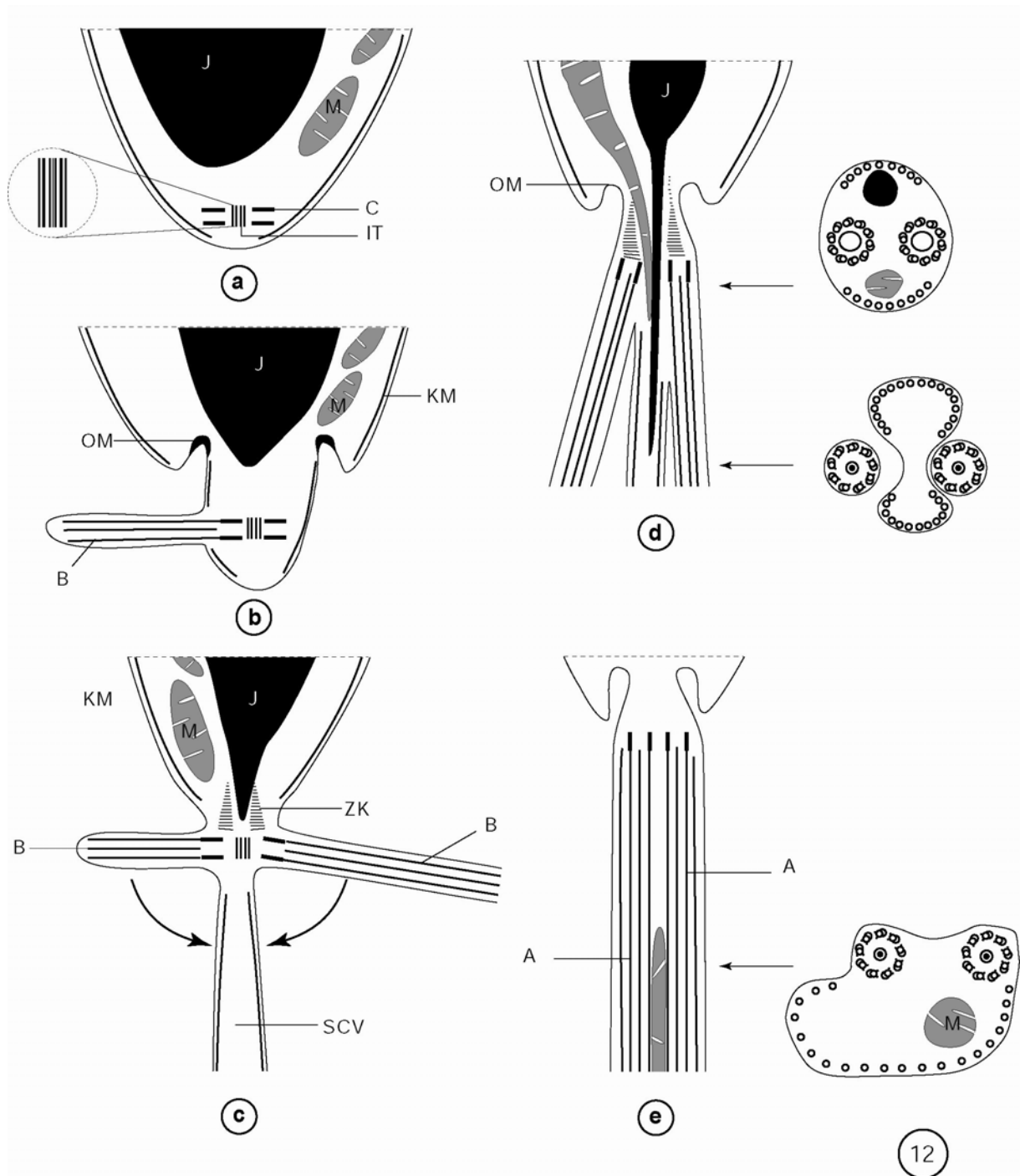
Spermatida má uvnitř těla mitochondrii. Kortikální mikrotubuly jsou na příčném řezu dobře viditelné po celém obvodu (obr. 9). Odlišné fáze spermioogeneze jsou viditelné na kresbě (obr. 12).

4.2. Ultrastruktura spermie

Zralé spermie se u druhu *Aspidogaster limacoides* po spermioogenezi nacházejí v tenkých kanálcích (*vasa efferentia*) (obr. 13). Pod povrchem spermie jsou po jejím obvodu v cytoplasmě přítomny kortikální mikrotubuly. Spermie mají dvojici axonem uspořádanou podle vzoru 9 + '1' (Trepaxonemata). Na příčném řezu spermii rozlišujeme sedm částí s rozdílnou ultrastrukturou. Schéma struktury spermie je vyobrazena níže (obr. 25).



Obr. 5–11. Spermioogeneze *Aspidogaster limacoides*. **5** – Mitochondrie obklopují velké kruhové jádro, bičíky připojené centriolami k intercentriolárnímu tělísku jsou v zóně utváření, měřítko = 1 μ m; **6** – Počáteční fáze rotace bičíku, měřítko = 2 μ m; **7** – Bičíky pokračují v rotaci, mitochondrie migrují k jádru, zvětšuje se zóna utváření, měřítko = 1 μ m; **8** – Objevují se žíhané kořeny (striated rootlets), začíná kondenzovat jaderný chromatin, měřítko = 1 μ m; **9** – Mladá spermatida, dobře viditelné axonemy, kortikální mikrotubuly a mitochondrie, měřítko = 300 nm; **10** – Oddělení mladé spermatidy v místě oblé membrány, kde je začátek utváření těla spermatidy, měřítko = 1 μ m; **11** – Mitochondrie splývá, axonemy po splnutí se středním cytoplasmatickým výběžkem putují do zóny utváření, měřítko = 1 μ m **Vysvětlivky:** A – axonemy, B – bičíky, C – centriola, EDZ – elektrondensní zóna, G – glykogen, J – jádro, K – kanál chámovodu, KM – kortikální mikrotubuly, M – mitochondrie, IT – intercentriolární tělísko, OM – ohraničující membrána, SCV – střední cytoplasmatický výběžek, UM – undulující membrána, ZK – žíhané kořeny.



Obr. 12. Schéma průběhu spermiogeneze *Aspidogaster limacoides* (popis jednotlivých fází – viz text strana 11).

Oblast I (obr. 14) tvoří přední část spermie, ve kterém se nachází pouze dvojice axonem, okolo nichž je malé množství cytoplasmy. Pod plasmatickou membránou je jedna vrstva kortikálních mikrotubulů. Každá axonema je tvořena centrálním jádrem a devíti dvojicemi periferních mikrotubulů, které jsou v této části spermie kompletně vyvinuty.

Oblast II (obr. 15, 16, 18). Tato zóna je charakterizována přítomností dvojice axonem a undulující membrány (*undulating membrane*). Membrána vybíhá mimo oblast těla spermie a celý prostor je vyplněn velkým množstvím kortikálních mikrotubulů. Undulující membrána je nejužší v oblasti ležící nejbliže k přední části spermie obsahuje 50–60 kortikálních mikrotubulů (obr. 15), střední část je nejdelší (obr. 16) a od této části dochází opět ke zkracování membrány, tato zkracující se část je vyplněna 160–170 kortikálními mikrotubuly (obr. 18).

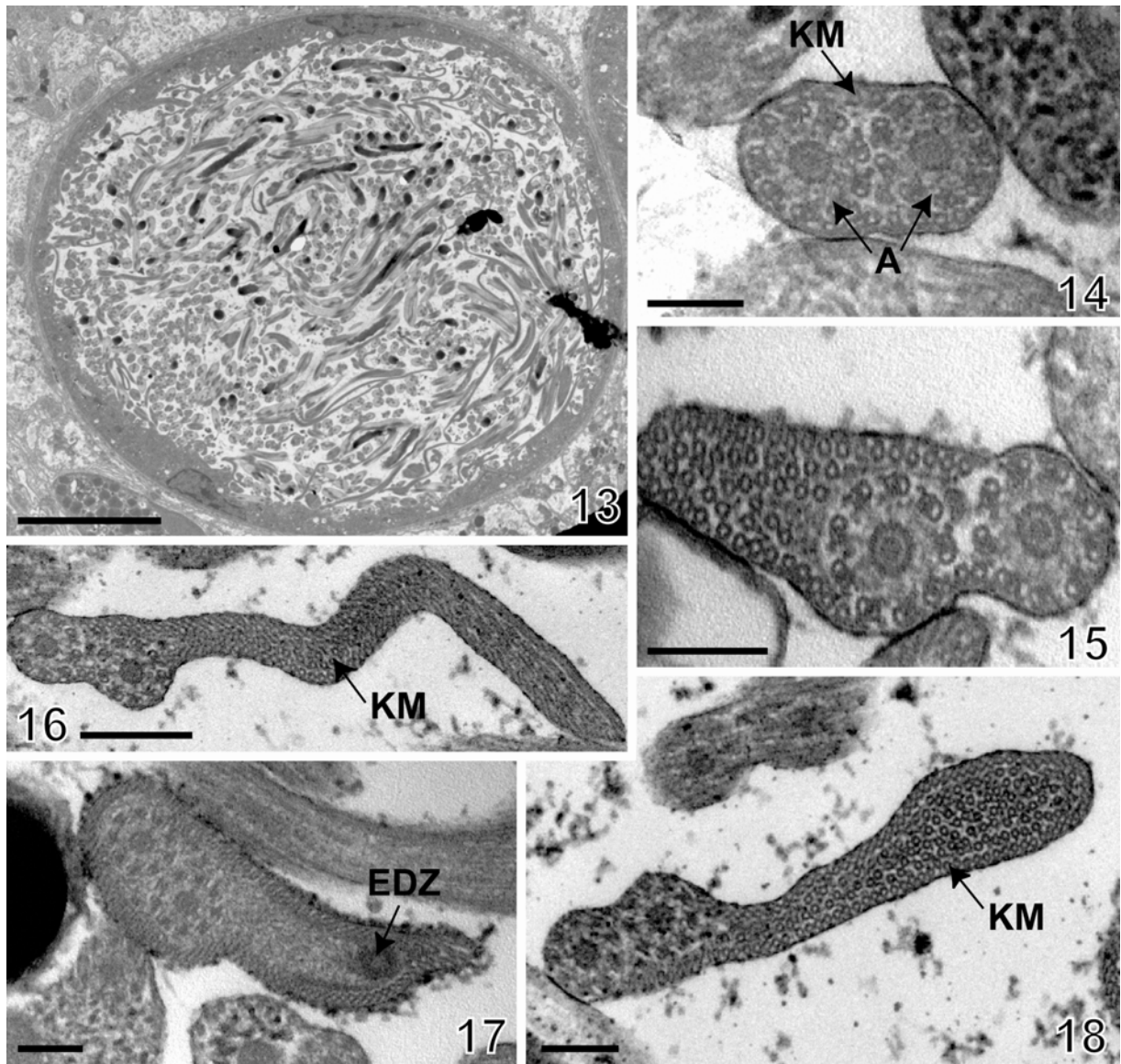
Oblast III (obr. 17, 19). V první části této oblasti je viditelná dvojice axonem, malá undulující membrána a elektrondensní zóna. Nejprve se nachází v okrajové části obklopené undulující membránou a současně se zkracováním membrány dochází k jejímu posunování směrem ke dvojici axonem. Undulující membrána zaniká. Začíná se objevovat mitochondrie (obr. 19), která je dobře viditelná na podélném řezu spermií. Kortikální mikrotubuly se nacházejí okolo plasmatické membrány.

Oblast IV (obr. 20). V této části spermie mizí elektrondensní oblast a je viditelná mitochondrie a dvojice axonem. Výživu pro axonemy představuje glykogen v podobě drobných tmavých granulí. V této části jsou axonemy v povrchové oblasti spermie a nejsou obklopeny žádnými mikrotubuly, pouze plasmatickou membránou ohraničující spermii od okolního prostředí. Kortikální mikrotubuly jsou umístěny ve dvou oblastech, které od sebe odděluje dvojice axonem. V cytoplasmě spermie jsou přítomny granule glykogenu.

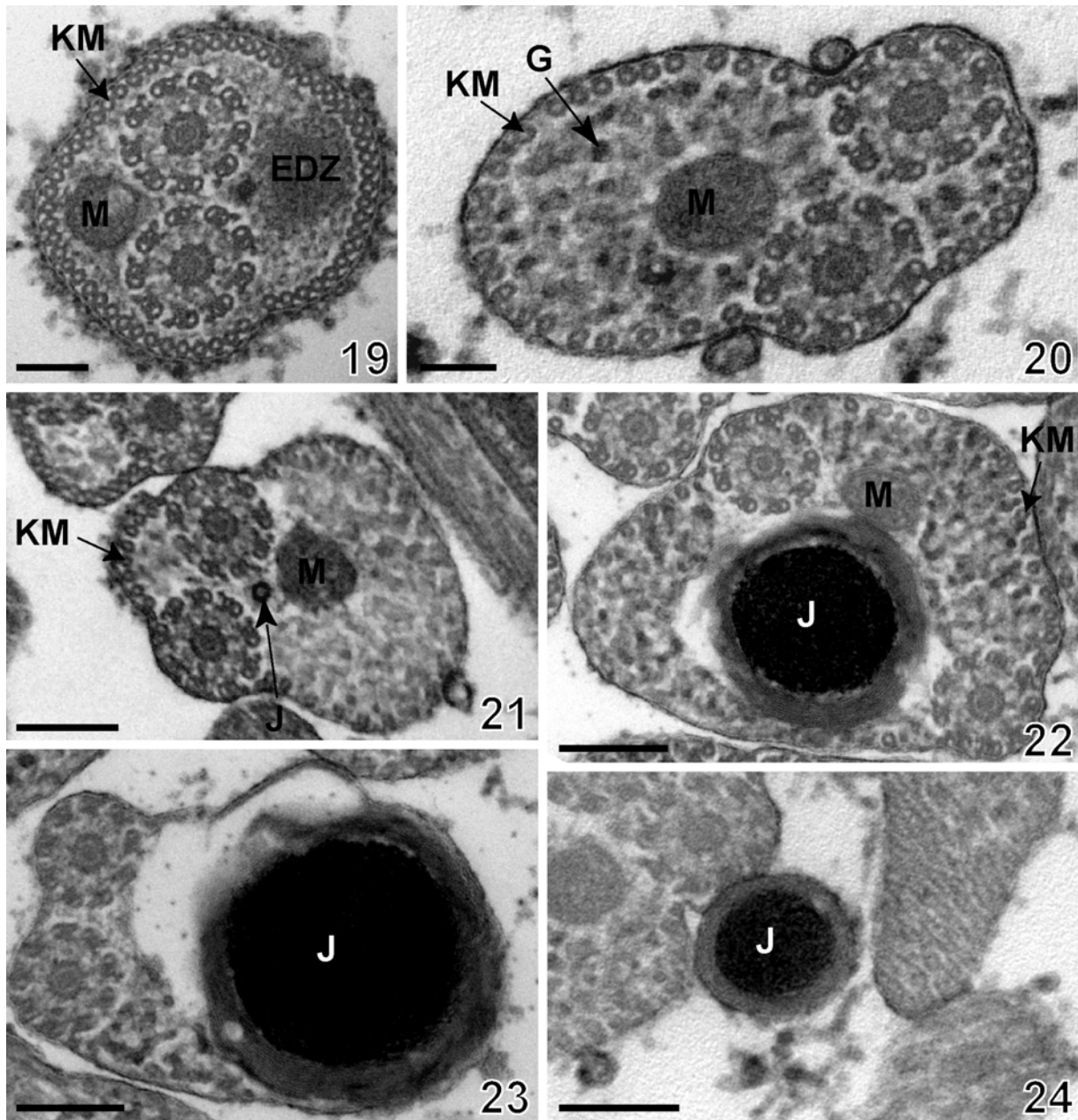
Oblast V (obr. 21, 22). Tmavé, zřetelně ohraničené místo ležící poblíž mitochondrie značí přítomnost jádra, které je viditelné až v druhé polovině těla spermie. Směrem ke koncové části spermie jádro zvětšuje svůj průměr a naopak mitochondrie se zužuje (obr. 22). Současně se zvětšováním jádra dochází k rozestupování axonem a dalšímu snižování počtu mikrotubulů na vnitřní straně plasmatické membrány spermie. Kortikální mikrotubuly jsou stále ve dvou oblastech, výživu pro axonemy zajišťují granula glykogenu.

Oblast VI (obr. 23). Tato zóna je charakterizována přítomností jádra a dvojicí axonem. Mitochondrie se stále zmenšuje až zcela mizí směrem k zadnímu konci spermie. Většinu vnitřní části spermie tvoří velké jádro. Axonemy jsou v původní pozici v těsné blízkosti u sebe. Kortikální mikrotubuly už nejsou viditelné.

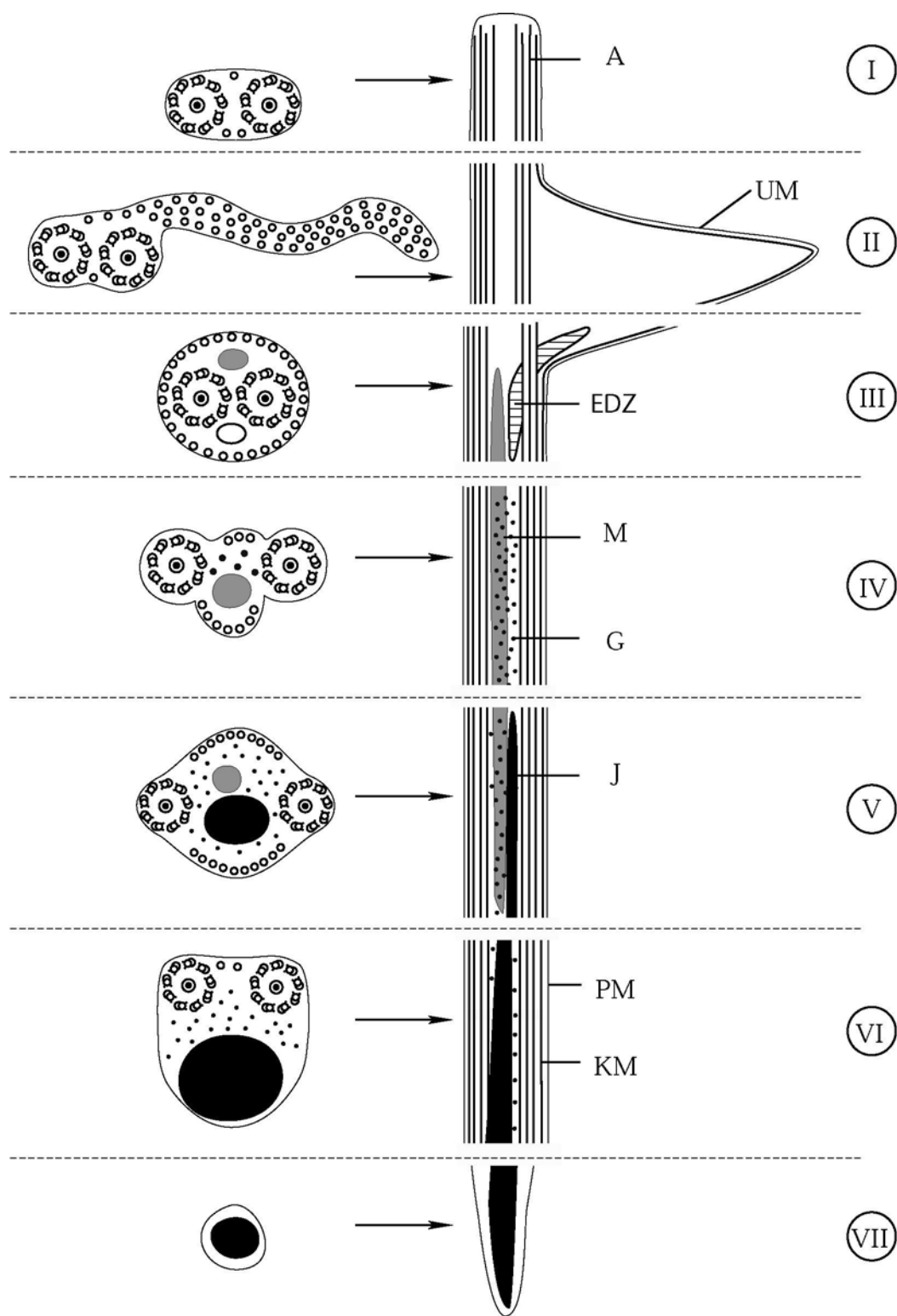
Oblast VII (obr. 24). V koncové části spermie už je přítomno pouze velké jádro, které je zřetelně ohraničené.



Obr. 13–18. Ultrastruktura spermie *Aspidogaster limacoides*. **13** – Spermie v tenkém kanálku (*vasa efferentia*), měřítko = 10 μ m; **14 (oblast I)** – Dvojice axonem (A) v přední části spermie, dobře viditelné uspořádání podle vzoru trepaxonemat, měřítko = 100 nm; **15 (oblast II)** – Počáteční část undulující membrány s malým množstvím kortikálních mikrotubulů (KM), měřítko = 200 nm; **16 (oblast II)** – Velmi dlouhá undulující membrána vyplněná kortikálními mikrotubuly (KM), měřítko = 300 nm; **17 (oblast III)** – Stále protažená undulující membrána, ve které se utváří elektrondensní zóna (EDZ), měřítko = 200 nm; **18 (oblast II)** – Zkracující se undulující membrána vyplněná kortikálními mikrotubuly (KM), měřítko = 200 nm.



Obr. 19–24. Ultrastruktura spermie *Aspidogaster limacoides*. **19 (oblast III)** – Příčný řez tělem spermie, na kterém je dobře viditelná mitochondrie (M), elektrondensní zóna (EDZ), axonemy, periferní kortikální mikrotubuly (KM), měřítko = 100 nm; **20 (oblast IV)** – Axonemy jsou na periferní části těla spermie, nejsou obklopeny kortikálními mikrotubuly (KM), mitochondrie (M) zvětšuje svůj průměr, jsou dobře viditelná granula glykogenu (G) měřítko = 100 nm; **21 (oblast V)** – Viditelné jádro (J) a mitochondrie (M) jsou v oblasti mezi axonemami, tmavá granula glykogenu slouží jako výživa pro dvojici axonem, kortikální mikrotubuly (KM) jsou rozděleny do dvou oblastí, měřítko = 200 nm; **22 (oblast V)** – Jádro (J) zvětšuje svůj průměr a zabírá většinu těla spermie, mitochondrie (M) se zmenšuje, vlivem zvětšování těla spermie se rozestupují kortikální mikrotubuly (KM), měřítko = 200 nm; **23 (oblast VI)** – Tělo spermie vyplňuje pouze jádro (J) a dvojice axonem, v této části nejsou přítomny kortikální mikrotubuly a mitochondrie, měřítko = 200 nm; **24 (oblast VII)** – Příčný řez zadního konce s velkým jádro (J), měřítko = 200 nm.



25

Obr. 25. Schéma spermie (vlevo příčný řez, uprostřed podélný řez). Jednotlivé zóny spermie (I – VII) – viz text strana 11, 14.

5. Diskuse

Během procesu spermiogeneze u motolice *Aspidogaster limacoides* je formována zóna utváření, ve které jsou velmi dobře rozlišitelné jednotlivé části (intercentriolární tělísko, centrioly, bičíky), což jsou znaky shodné s ostatními doposud studovanými zástupci této skupiny (*Rugogaster hydrolagi*, *Multicotyle purvisi*, *Lobatostoma manteri*) (Watson a Rohde 1991, 1992, Rohde a kol. 1991).

Část spermiogeneze u druhu *Multicotyle purvisi* probíhá stejně jako u druhu *Lobatostoma manteri*, ale některé její části jsou jiné. Jsou formovány nerozlišené zóny utváření a místo axonem a mikrotubulů jsou v této oblasti shromážděny intercentriolární tělísko a žíhané kořeny. V poslední fázi spermiogeneze je vytvořena oblá membrána a spermie je oddělena od místa, kde došlo k jejímu utváření (Watson a Rohde 1991).

Žíhané kořeny stabilizují axonemy při jejich splnutí se středním cytoplasmatickým výběžkem. Intercentriolární tělísko může sloužit jako pomocná podjednotka, z které mohou být axiální filamenty polymerizovány (Burton 1972), a může hrát důležitou roli při prodlužování buňky během spermiogeneze (Sopott-Ehlers 1990). U čeledi Loimoidae nebyly žíhané kořeny ani intercentriolární tělísko popsány, ale volné bičíky se vytváří, a některé druhy (např. *M. purvisi*) mají žíhané kořeny a intercentriolární tělísko, ale nevytváří se volné bičíky. Intercentriolární tělísko je obvykle umístěno mezi dvěma centriolami a je doprovázeno přítomností žíhaných kořenů, které jsou vždy nalezeny společně s intercentriolárním tělískem (Watson a Rohde 1991). U studovaného druhu *A. limacoides* jsou bičíky k intercentriolárnímu tělísku připojeny pomocí centriol. Intercentriolární tělísko je stejně jako u ostatních druhů umístěno mezi bičíky a má velmi charakteristickou strukturu (šest elektronodensních vrstev oddělených pěti elektronlucentními vrstvami).

Intercentriolární tělísko je znakem probíhající spermiogeneze u mnoha platyhelminťů ze skupiny Trepaxonemata (Ehlers 1985). Tělísko bylo zřejmě ztraceno druhotně u motolice druhu *Gonapodasmius epinepheli* (Digenea) (Justine a Mattei 1982), a monogeneí podtřídy Monopisthocotylea (Justine 1991b). Odlišné struktury mají zřejmě i různou funkci. Intercentriolární tělísko se buď vyvinulo nezávisle v různých skupinách nebo jako synapomorfie pro všechna Trepaxonemata, ale jeho struktura a funkce byly sekundárně modifikovány v odlišných skupinách. Další detailní pozorování struktury a změn intercentriolárního tělíška mohou pomoci při posuzování fylogenetických vztahů plathelminťů (Watson a Rohde 1995).

Mezi druhy *A. conchicola* a *A. limacoides* byly zjištěny velké rozdíly (viz. tabulka 2), které jsou pravděpodobně způsobeny nedostatečnou studií ultrastruktury spermie *A. conchicola*. Ve studii o tomto druhu je pouze sedm obrázků, které sice zachycují jednotlivé části s rozdílnou ultrastrukturou, ale neposkytují nám dostatečné údaje o znacích, které byly nalezeny ve spermii *A. limacoides*. Nedostatky u *A. conchicola* jsou patrně důsledkem špatné přípravy vzorků.

Stavba spermií u podtřídy Aspidogastrea vykazuje znaky považované v rámci Trepanonemata jako symplesiomorfní znak. Mají dvojici axonem uspořádanou podle vzoru 9 + '1' a dorsoventrální mikrotubuly. Densní oblast v přední části spermie by mohla být považována za synapomorfii pro podtřídu Aspidogastrea. Undulující membrána spermií druhů *L. manteri* a *M. purvisi* je podobná membráně zjištěné u zástupce monogeneí (*Gotocotyla acanthophallus*) a mohla by být považována za znak podporující příbuznost Trematoda a Monogenea (Justine 1995).

Tabulka 2. Přítomnost znaků charakterizujících spermiogenezi a spermii u skupiny Aspidogastrea. **Legenda:** EDZ – elektrondensní zóna, G – glykogen, MP – mitochondrie (počet), UM – undulující membrána, ZU – zóna utváření, + přítomnost, - absence.

Zástupce	ZU	EDZ	UM	MP	G	Autor studie
<i>Aspidogaster conchicola</i>	není přesně známo	-	-	2	-	Bakker a Diegenbach 1973
<i>Aspidogaster limacoides</i>	+	+	+	1	+	Tato studie
<i>Lobatostoma manteri</i>	+	+	+	1	-	Rohde a kol. 1991
<i>Multicotyle purvisi</i>	-	+	+	1	+	Watson a Rohde 1991
<i>Rugogaster hydrolagi</i>	+	pouze ve spermatidě, chybí ve zralé spermii	-	1	není přesně známo	Watson a Rohde 1992

Zralé spermie druhu *L. manteri* mají znaky, které byly nalezené i u jiných zástupců skupiny Neodermata – Monogenea a Trematoda. Mezi tyto znaky patří dvojice axonem uspořádaných podle vzoru 9 + '1', periferní mikrotubuly, prodloužené jádro a mitochondrie (Rohde a kol. 1991). Vrstevnaté tělo (*lamellate body*) bylo nalezeno u *L. manteri* a vyskytuje

se také u *M. purvisi*. U druhu *A. conchicola* pravděpodobně představuje druhou mitochondrii (Bakker a Diegenbach 1973). Podobná struktura byla také popsána v nejaderné oblasti zralé spermie u zástupců Monogenea – podtřídy Polyopisthocotylea (Justine a Mattei 1985), u Digenea (Justine a Mattei 1982) a u tasemnice druhu *Austramphilina elongata* (Cestoda) (Rohde a Watson 1986). U *A. conchicola* byla v undulující membráně a také v těle zralé spermie nalezena elektrondensní zóna, která představuje strukturu shodnou s vrstevnatým tělem u výše zmíněných zástupců. U *A. limacoides* byla nalezena elektrondensní zóna, která může být druhou mitochondrií. Abychom rozeznali tyto dvě struktury (mitochondrie, elektrondensní zóna) přesně museli bychom provést imunocytochemickou metodu, která by nám tento problém pomohla vyřešit.

Znakem, který odlišuje spermii *L. manteri* a *A. conchicola* od *M. purvisi*, je část, která bočně vybíhá z těla spermie (undulující membrána), která je u *L. manteri* přítomna po celé délce spermie (Rohde a kol. 1991, Bakker a Diegenbach 1973, Watson a Rohde 1991). Tato struktura obsahuje mnoho mikrotubulů a je charakterizovaná střídajícími se tenkými a širokými proužky a povrchovým prstencem. Podobně vypadající struktura, ale s méně kontrastními částmi (tenké a tlusté proužky) byla nalezena podél části spermie u motolic (Jamieson a Daddow 1982) a u monogeneí (Justine a Mattei 1983, 1985). Funkce této laločnaté části není známá, ale patrně pomáhá spermii při posouvání chámovodem (*vas deferens*) směrem k vaječné buňce (Justine 1995).

Spermie *A. conchicola* a *M. purvisi* se navzájem liší v několika znacích: *M. purvisi* má více kortikálních mikrotubulů, jelikož má uvnitř těla spermie více protoplasmy a její spermie jsou někdy spojeny mezi sebou (Bakker a Diegenbach 1973, Watson a Rohde 1991). Tento znak nebyl u *A. conchicola* nalezen. Bylo také zjištěno, že spermie *A. conchicola* má na rozdíl od *M. purvisi* jen jednu řadu kortikálních mikrotubulů (Bakker a Diegenbach 1973). U zkoumaného druhu *A. limacoides* byla nalezena také pouze jedna řada kortikálních mikrotubulů a jeho spermie nejsou spojeny s jinými, což jsou znaky shodné s *A. conchicola*.

Ve zralé spermii druhu *M. purvisi* byly pozorovány některé znaky shodné s druhem *L. manteri* (Rohde a kol. 1991). U obou druhů se vytváří oblast s undulující membránou a elektrondensním materiálem. Spermatidy nejsou utvářeny v rosetě s okolní zónou utváření, ale rozvíjejí se ve společné hmotě, která tvoří intercentriolární tělísko, basální tělo, axonemy, žíhané kořeny a shluky mikrotubulů. Oblá membrána se tvoří jen v pozdější fázi a rostoucí spermatidy fúzí s axonemami (Watson a Rohde 1995). U spermie *M. purvisi* není formována dobře rozeznatelná zóna utváření. Undulující membrána je viditelná jen blízko

proximálního konce rostoucí spermatidy, žíhané kořeny a intercentriolární tělísko jsou viditelné v cytoplasmě (Watson a Rohde 1991).

Podtřída Aspidogastrea je co se týče spermiogeneze a struktury spermie celkem heterogenní (viz tab. 2). U druhu *A. conchicola* byla doposud provedena pouze studie ultrastruktury spermie, která byla provedena před více než třiceti lety (Bakker a Diegenbach 1973). Získání údajů o průběhu spermiogeneze u tohoto druhu by pomohlo upřesnit fylogenetické vztahy mezi jedinci celé podtřídy.

6. Závěr

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie byl studován a charakterizován proces spermiogeneze a ultrastruktura zralých spermií u druhu *Aspidogaster limacoides* parazita plotice obecné, zástupce bazální skupiny motolic (Aspidogastrea).

Spermiogeneze je u této motolice v hlavních krocích shodná s ostatními zástupci čeledi Aspidogastrea. Na základě literárních údajů i výsledků předkládané studie lze průběh tvorby spermií a jejich ultrastrukturu u tohoto druhu charakterizovat následovně:

1. Tělo spermie má šest oblastí s rozdílným ultrastrukturálním charakterem.
2. Velmi zajímavou částí těla spermie u *A. limacoides* je oblast s undulující membránou, která byla doposud nalezena pouze u druhů *Multicotyle purvisi* a *Lobatostoma manteri*.
3. Elektrondensní zóna je pozorovatelná v mladých i ve zralých spermiích u druhů *Multicotyle purvisi*, *Lobatostoma manteri* a *A. limacoides*, zatímco u druhu *Rugogaster hydrolagi* byla nalezena pouze ve spermatidě a u *Aspidogaster conchicola* nebyla nalezena vůbec.
4. Přední část těla spermie tvoří dvojice axonem a koncovou část tvoří pouze jádro.
5. Během spermiogeneze se u všech druhů s výjimkou *Multicotyle purvisi* utváří dobře pozorovatelná zóna utváření.

7. Použitá literatura

Bakker K.E., Diegenbach P.C. 1973: The ultrastructure of spermatozoa of *Aspidogaster conchicola* Baer, 1826 (Aspidogastrea, Trematoda). Netherlands Journal of Zoology 23: 345–346

Blair D. 1993: The phylogenetic position of the Aspidobothrea within the parasitic flatworms inferred from ribosomal RNA sequences data. International Journal for Parasitology 23: 169–178

Burton P.R. 1972: Fine structure of the reproductive system of a frog lung fluke. III. The spermatozoon and its differentiation. Journal of Parasitology 58: 68–83

Bykhovskaya-Pavlovskaya I.E., Gusev A.V., Dubinnia M.N., Izyumova N.A., Smirnova T.S., Sokolovskaya I.L., Shtein G.A., Shul'man S.S., Epshtein V.M. 1962: Key to Parasites of Freshwater Fish of the USSR. Moskva – Leningrad, Israel's Program for Scientific Translations, Jerusalem 910 pp.

Bykhovsky I., Bykhovskaya B. 1934: Über die Morphologie und die Systematik des *Aspidogaster limacoides* Diesing 1835. Zeitschrift für Parasitenkunde 7: 125–137

Cribb T.H., Bray R.A., Olson P.D., Littlewood D.T.J. 2003: Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny. Advances in Parasitology 54: 197–254

Diesing C.M. 1835: *Aspidogaster limacoides*, eine neue Art Bunnenvurm. Medicinische Jahrbücher des k.k. österreichischen Staates 16 (VII): 420–431

Dollfus R.-P. 1958: Trématodes. Sous-classe Aspidogastrea. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée 33: 305–395

Duvaux-Miret O., Maratte B., Dissous C., Capron A. 1991: Molecular cloning and sequencing of the alpha-tubulin gene from *Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology 49: 337–340

Ehlers U. 1985: Das Phylogenetische System der Platyhelminthes. Gustav Fischer, Stuttgart 317 pp.

Evlanov I.A. 1990: Distribution of the trematode *Aspidogaster limacoides* in a population of roach (*Rutilus rutilus*) as a function of the age and sex of the host. Zoologicheskii Zhurnal 69: 132–134 (In Russian)

Faust E.C., Tang C.C. 1936: Notes on new aspidogatrid species, with a consideration of the phylogeny of the group. Parasitology 28: 487–501

Fredericksen D.W. 1978: The fine structure and phylogenetic position of the cotylocidium larva of *Cotylogaster occidentalis* Nickerson 1902 (Trematoda, Aspidogastridae). Journal of Parasitology 64: 961–976

Gibson D.J., Chinabut S. 1984: *Rohdella siamensis* gen. et sp. nov. (Aspidogastridae: Rohdellinae subfam. nov.) from freshwater fishes in Thailand, with a reorganization of the classification of the subclass Aspidogastrea. Parasitology 88: 383–393

Hendrix S.S., Overstreet R.M. 1977: Marine aspidogastrids (Trematoda) from fishes in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Parasitology* 63: 810–817

Henley C., Costello D.P., Thomas M.B., Newton W.D. 1969: The 9 + '1' pattern of microtubules in spermatozoa of *Mesostoma* (Platyhelminthes, Turbellaria). *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* 64: 849–856

Horák P., Scholz T. 1998: Biologie helmintů. Skripta PřF UK, Karolinum, Praha 139 pp.

Ip H.S., Desser S.S. 1984: Transmission electron microscopy of the tegumentary sense organs of *Cotylogaster occidentalis* (Trematoda: Aspidogastrea). *Journal of Parasitology* 70: 563–575

Ip H.S., Desser S.S., Weller I. 1982: *Cotylogaster occidentalis* (Trematoda, Aspidogastrea): scanning electron microscopic observations of sense organs and associated surface structures. *Transactions of the American Microscopical Society* 100: 253–261

Jamieson B.G.M., Daddow L.M. 1982: The ultrastructure of the spermatozoon of *Neochasmus* sp. (Cryptogonimidae, Digenea, Trematoda) and its phylogenetic significance. *International Journal for Parasitology* 12: 547–559

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

Justine J.-L. 1991b: Cladistic study in the Monogenea (Platyhelminthes), based upon a parsimony analysis of spermiogenetic and spermatozoal characters. *International Journal for Parasitology* 21: 821–838

Justine J.-L. 1991c: Spermatozoa as a tool for taxonomy of species and supraspecific taxa in the Platyhelminthes. In: Baccetti B. (ed) *Comparative Spermatology 20 Years After.*: Raven Press, New York pp. 981–984

Justine J.-L. 1995: Spermatozoal ultrastructure and phylogeny of the parasitic Platyhelminthes. In: Jamieson B.G.M., Ausio J., Justine J.-L. (eds.) *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy.* Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle 166: 55–86

Justine J.-L. 1997: La classification générale des Plathelminthes parasites: changements récents et utilisation des caractères ultrastructuraux, en particulier des spermatozoïdes. *Bulletin de la Société Française de Zoologie* 122: 226–277

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 pp. 231–238

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

- Justine J.-L., Mattei X. 1982:** Étude ultrastructurale de la spermiogenèse et du spermatozoïde d'un Platyhelminthes: *Gonapodasmius* (Trematoda: Didymozoidae). *Journal of Ultrastructure Research* 79: 350–365
- Justine J.-L., Mattei X. 1983:** Comparative ultrastructural study of spermiogenesis in monogeneans (flatworms) 2. *Heterocotyle* (Monopisthocotylea, Monocotylidae). *Journal of Ultrastructure Research* 84: 213–223
- Justine J.-L., Mattei X. 1984:** Atypical spermiogenesis in a parasitic flatworm, *Didymozoon* (Trematoda, Digenea: Didymozoidae). *Journal of Ultrastructure Research* 87: 106–111
- Justine J.-L., Mattei X. 1985:** Particularités ultrastructurales des spermatozoïdes de quelques Monogènes Polyopisthocotylea. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, Paris* 7: 143–152
- Littlewood D.T.J., Rohde K., Clough K.A. 1999:** The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules. *Biological Journal of the Linnean Society* 66: 75–114
- Litvaitis M.K., Rohde K. 1999:** A molecular test of platyhelminth phylogeny: inferences from partial 28S rDNA sequences. *Invertebrate Biology* 118: 42–56
- Monticelli F.S. 1892:** *Cotylogaster michaelis* n. g., n. sp. on revisione degli Aspidobothridae. In: Taschenberg E.O.W. (ed.). *Festschrift zum Siebenzigsten Geburtstage R. Leuckarts: dem Verehrten Jubilar Dargebracht von Seinen Dankbaren Schülern* c. Leipzig pp. 168–214
- Nagibina L.F., Timoveeva T.A. 1971:** True hosts of *Aspidogaster limacoides* Diesing, 1835 (Trematoda, Aspidogastrea). *Biological Sciences* 200: 677–678 (In Russian)
- Reuter M., Halton D.W. 2000:** Comparative neurobiology of Platyhelminthes. In: Littlewood D.T.J., Bray R.A. (eds.) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, pp. 239–249
- 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
- Rohde K. 1972:** The Aspidogastrea, especially *Multicotyle purvisi* Dawes, 1941. *Advances in Parasitology* 10: 77–151
- Rohde K. 1973:** Structure and development of *Lobatostoma manteri* sp. nov. (Trematoda, Aspidogastrea) from the Great Barrier Reef, Australia. *Parasitology* 66: 63–83
- Rohde K. 1975:** Early development and pathogenesis of *Lobatostoma manteri* Rohde (Trematoda, Aspidogastrea). *International Journal for Parasitology* 5: 597–607
- Rohde K. 1994:** The minor groups of parasitic Platyhelminthes. *Advances in Parasitology* 33: 145–234
- Rohde K. 2002:** Subclass Aspidogastrea Faust & Tang, 1936. In: Gibson D.I., Jones A., Bray R.A. (eds.) *Keys to the Trematoda Volume 1*. CAB International and The Natural History Museum, London pp. 5–14

- Rohde K., Watson N.A. 1986:** Ultrastructure of spermatogenesis and sperm of *Austramphilina elongata* (Platyhelminthes, Amphilinidea). *Journal of Submicroscopic Cytology* 18: 361–374
- Rohde K., Watson N.A., Cribb T. 1991:** Ultrastructure of sperm and spermatogenesis of *Lobatostoma manteri* (Trematoda, Aspidogastrea). *International Journal for Parasitology* 21: 409–419
- Shapiro J.E., Hershenov B.R., Tulloch G.S. 1961:** The Fine Structure of *Haematoloechus* Spermatozoan Tail. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9: 211–217
- Silveira M. 1969:** Ultrastructural studies on a nine plus one flagellum. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 274–288
- Silveira M. 1975:** The fine structure of 9 + '1' flagella in turbellarian flatworms. In: Afzelius B.A. (ed.) *The Functional Anatomy of the Spermatozoon*. Pergamon Press, Oxford, pp. 289–298
- Smyth J.D., Halton D.W. 1983:** *The Physiology of Trematodes*. Cambridge University Press, Cambridge 446 pp.
- Sopott-Ehlers B. 1990:** Functional aspects of the intercentriolar body in the spermiogenesis of *Nematoplana coelogyneporoides* (Platyhelminthes, Proseriata). *Zoomorphology* 109: 245–249
- Volf P., Horák P. 2007 eds.:** *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha 318 pp.
- Watson N.A., Rohde K. 1991:** Ultrastructure of spermatogenesis and sperm of *Multicotyle purvisi* (Platyhelminthes, Aspidogastrea). *Zoomorphology* 110: 347–356
- Watson N.A., Rohde K. 1992:** Ultrastructure of sperm and spermatogenesis of *Rugogaster hydrolagi* Schell, 1973 (Platyhelminthes, Trematoda, Aspidogastrea, Rugogastridae). *Parasitology Research* 78: 516–524
- Watson N.A., Rohde K. 1995:** Re-examination of spermatogenesis of *Multicotyle purvisi* (Platyhelminthes, Aspidogastrea). *International Journal for Parasitology* 25: 579–586
- Yamaguti S. 1936:** *Systema Helmithum*. IV. Monogenea and Aspidocotylea. Interscience Publisher, London, New York 699 pp.
- Zhokhov A.E. 2001:** The study of the transition of cyprinid fish to feeding on mollusc *Dreissena polymorpha* (Bivalvia, Dreissenidae) in the Rybinsk Reservoir using parasite *Aspidogaster* (Aspidogastrea, Aspidogastridae). *Journal of Ichthyology* 41: 620–624