

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Pedagogická fakulta

Katedra biologie

**Spermatogeneze u dlouhověkého druhu vodních
ploštic hladinatky člunohřbeté (*Velia caprai*)
(Heteroptera: Gerromorpha: Veliidae)**

Lucie Bělinová

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Miroslav Papáček, CSc.

České Budějovice 2011

ABSTRAKT:

Bělinová L. 2011: Spermatogeneze u dlouhověkého druhu vodních ploštic hladinatky člunohřbeté (*Velia caprai*) (Heteroptera: Gerromorpha: Veliidae). Magisterská diplomová práce, Jihočeská univerzita, Pedagogická fakulta, České Budějovice. 50 s.

V této práci byla studována spermatogeneze dlouhověkého druhu hladinatky (*Velia caprai*) u nymf 5. instaru, dospělců definovaného stáří (v rozmezí 1 – 60 dnů po svlečení) a dospělců z terénu před a po přezimování. Spermatogeneze tohoto druhu probíhá kontinuálně. První spermatidy byly pozorovány už u nymf 5. instaru, zralé spermie u dospělců jeden den po svlečení. U starších dospělců i dospělců po přezimování byly zjištěny všechny typy buněk spermatogeneze: spermatogonie, primární a sekundární spermatocyty, spermatidy i spermie.

Varle samců *Velia caprai* je v rámci ploštic i hmyzu obecně poměrně atypické. Je tvořeno jediným testikulárním folikulem, který je širší než dlouhý. Vrchol folikulu není zřetelně formován; germarium leží uprostřed širší strany folikulu protilehlé ústí chámovodu.

Klíčová slova: *Velia caprai*, spermatogeneze, varlata, Heteroptera, střední Evropa

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Miroslav Papáček, CSc.

Pedagogická fakulta Jihočeské univerzity, Katedra biologie

Diplomová práce byla řešena v rámci výzkumného záměru MSM 6007665801.

ABSTRACT:

Bělinová L. 2011: Spermatogenesis in long lived species of water bugs – water cricket (*Velia caprai*) (Heteroptera: Gerromorpha: Veliidae). MSc. Thesis, University of South Bohemia, Faculty of Education, České Budějovice. 50 pp.

This diploma thesis is devoted to the spermatogenesis of long living water bug species – water cricket (*Velia caprai*). Spermatogenesis of nymphs of the fifth instaru, adults of defined age (from 1 up to 60 days after the ecdysis) and also the adults caught in the field of unknown age before - and after the hibernation were studied by histological methods. It was discovered that spermatogenesis of this species is in progress continuously. Even the nymphs of the 5th instar already had spermatids presented and the adult males disposed of spermatozoans just one day after the ecdysis. The presence of all the spermatogenesis cell types (spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, spermatids and sperms) was confirmed in the case of male adults of various age – younger after ecdysis as well as older including males after hibernation. Semiaquatic bug *Velia caprai* has not typical testes in comparison with most of Insects. They are formed by just one testicular follicle which is wider than longer. The follicle's top is not distinctly formed; the germanium is located in the middle of the follicle's wider part which is across from the testicle's orifice to vas deferens. This anomalous position of germarium represents the original apex of testicular follicle in this species.

Keywords: *Velia caprai*, spermatogenesis, testes, Heteroptera, Central Europe

Supervisor: Prof. RNDr. Miroslav Papáček, CSc.

University of South Bohemia, Faculty of Education, Department of Biology

This project was supported by grant of the Czech Ministry of Education Youth and Sports No. 6007665801.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím konzultací s vedoucím diplomové práce. Veškerá použitá literatura je uvedena v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Ve Zruči nad Sázavou 22. 4. 2011

Lucie Bělinová

Děkuji prof. RNDr. Miroslavu Papáčkovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, za zájem a čas, který mi po celou dobu mé práce věnoval, PaedDr. Radce Závodské, Ph.D. za pomoc při přípravě trvalých histologických preparátů, RNDr. Tomáši Ditrichovi, Ph.D. za pomoc při sběru materiálu, vedení chovů, preparování a za další cenné rady, paní Mirce Krovové za trpělivost a poskytnutí technického zázemí, Mgr. Janu Petrovi, PhD. za pomoc při úpravě fotografií a také všem zaměstnancům katedry biologie PF JU, kteří v jakékoliv míře přispěli k vypracování této práce.

Děkuji i Karolíně Málkové, Ondřeji Vorlíčkovi, Lence Vilimovské, Jitce Pomikálové a své rodině za neocenitelnou pomoc a toleranci při vypracování této práce.

OBSAH:

1	Úvod.....	8
2	Literární přehled.....	9
2.1	Funkce a struktura samčí reprodukční soustavy hmyzu.....	9
2.2	Reprodukční soustava ploštic.....	11
2.3	Reprodukční soustava a spermatogeneze vybraných vodních ploštic... 11	
2.3.1	Bodule obecná (<i>Ilyocoris cimicoides</i>) (Heteroptera: Nepomorpha: Naucoridae).....	11
2.3.2	Hlubenka skrytá (<i>Aphelocheirus aestivalis</i>) (Heteroptera: Nepomorpha: Aphelocheiridae).....	13
2.3.3	Znakoplavka obecná (<i>Notonecta glauca</i>) (Heteroptera: Nepomorpha: Notonectidae).....	14
2.4	Reprodukční soustava hladinatky člunohřbetá (<i>Velia caprai</i>) (Heteroptera: Geromorpha: Veliidae).....	16
3	Materiál a metodika.....	18
3.1	Studovaný druh.....	18
3.2	Chovy a lokality sběru materiálu.....	18
3.2.1	Chov B (vedla Lucie Bělinová).....	19
3.2.2	Chov M (vedla Karolína Málková).....	20
3.2.3	Chov P (vedl vedoucí diplomové práce).....	21
3.3	Přezimování jedinců v chovech.....	22
3.4	Materiál z terénu odebíraný pro preparaci varlat a sledování spermatogeneze.....	22
3.5	Fixace a preparace.....	22
3.6	Příprava histologických preparátů varlat.....	24
3.6.1	Zalévání vzorků.....	24
3.6.2	Řezání.....	25
3.6.3	Barvení a příprava trvalých preparátů.....	25
3.7	Studium, vyhodnocování a dokumentace preparátů.....	27
3.8	Terminologie a zkratky.....	27
4	Výsledky.....	28
4.1	Stavba a orientace varlete; poloha germaria.....	28
4.2	Spermatogeneze u nymf 5. instaru a dospělců různého stáří.....	29

4.2.1	Nymfy 5. instaru.....	29
4.2.2	Dospělci definovaného stáří.....	31
4.2.2.1	Dospělci do 1 dne po ekdyzi.....	31
4.2.2.2	Dospělci do 7 dnů po ekdyzi.....	31
4.2.2.3	Dospělci do 14 dnů po ekdyzi.....	31
4.2.2.4	Dospělci do 25 dnů po ekdyzi.....	32
4.2.2.5	Dospělci 42 dnů po ekdyzi.....	32
4.2.2.6	Dospělci 60 dnů po ekdyzi.....	33
4.2.3	Dospělci nedefinovaného stáří odebrání z terénu.....	39
4.2.3.1	Samci před přezimováním.....	39
4.2.3.2	Samci po přezimování.....	39
4.3	Souhrn histologických a morfologických zjištění.....	44
5	Diskuze a závěry.....	46
6	Seznam literatury.....	49

1 ÚVOD

Studiemi v nedávné i starší minulosti bylo zjištěno, že hladinatka člunohřbetá *Velia caprai* (Heteroptera: Veliidae) má v závislosti na environmentálních podmínkách poměrně variabilní životní cykly (přehled viz Papáček, Jandová 2003). Ditrich (2005) vysvětlil tuto variabilitu sledovanou především fenologicky existencí časově oddělených kohort nymf a letní dormancí dospělců. Později bylo zjištěno, že tento druh je vlastně v rámci situace u semiakvatických ploštic dlouhověký (Ditrich, Papáček 2008).

Vývoj pohlavní soustavy a gametogeneze, resp. spermatogeneze, byly studovány u několika vodních ploštic. V poslední době se touto problematikou zabývali např.: Papáček a Gelbič (1989) u bodule obecné (*Ilyocoris cimicoides*), Papáček a Soldán (2008) u hlubenky skryté (*Aphelocheirus aestivalis*) a Papáček a Soldán (1992) u znakoplavky obecné (*Notonecta glauca*). Vývojem samčí pohlavní soustavy *Velia caprai* se zabýval s využitím morfologických metod studia Ditrich (2005) ve své diplomové práci. Spermatogeneze tohoto druhu však zatím podrobněji studována nebyla.

Vzhledem k tomu, že u jiného dlouhověkého druhu – bentické vodní plošnice hlubenky skryté (*Aphelocheirus aestivalis*; Heteroptera: Nepomorpha: Aphelocheiridae) bylo zjištěno, že spermatogeneze je kontinuální a atypická pro hmyz, vznikla otázka, zda tomu není u hladinatky *V. caprai* obdobně.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo proto zjistit, jak probíhá spermatogeneze u samců hladinatky *Velia caprai*. Snahou bylo zachytit průběh spermatogeneze u posledních nedospělých stadií - nymf 5. instaru, dospělých jedinců přesně definovaného stáří a přezimujících jedinců, popř. dospělců nedefinovaného stáří odchycených v terénu. Snahou také bylo zjistit variabilitu spermatogeneze za různých environmentálních podmínek. Proto byl materiál pro studium spermatogeneze (dospělí samci) odebírán ze tří chovů vedených souběžně za různých podmínek.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Funkce a struktura samčí reprodukční soustavy hmyzu

Většina druhů hmyzu patří mezi gonochoristy, kdy se obě pohlaví aktivně vyhledávají k páření (Hůrka, Čepická 1980). Mezi hlavní funkce samčí reprodukční soustavy patří produkce, uchování a nakonec dopravení spermií do pohlavní soustavy samice. Díky tomu také samice v některých případech získává i živiny, které zvyšují počet a rychlost produkce vajíček. U některých druhů totiž samčí pohlavní soustava produkuje látky, které jsou při kopulaci přenášeny do samičích pohlavních cest a regulují plodnost samice (Gillot 1995).

Součástí vnitřního samčího pohlavního systému u dospělého hmyzu jsou párová varlata (*testes*), párové chámovody (*vasa deferentia*), nepárový chámomet (*ductus ejaculatorius*), párové semenné váčky (*vesiculae seminales*), přídatné žlázy (*glandes accessoriae*) a pohlavní otvor (*gonoporus*) (Gillot 1995, Kovařík a kol. 2000, Obenberger 1952).

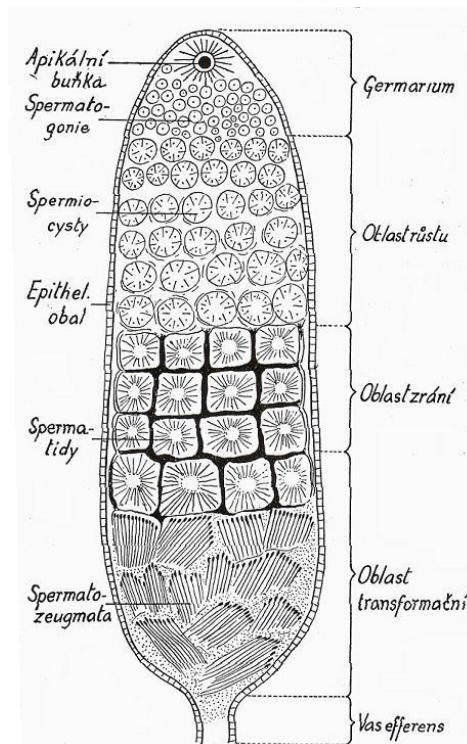
Varlata jsou nejčastěji umístěna pod střechem, ale mohou být i nad ním či laterálně. Mají oválný tvar a jsou složena z různého počtu tubicovitých struktur - testikulárních folikulů. Všechny folikuly, které tvoří varle, jsou obaleny peritoneálním obalem a do chámovodu vyúsťují krátkým vývodem *vas efferens*. Stěnu každého folikulu tvoří vrstva epitelu a na její vnější straně je bazální membrána. Podle toho, na jakém stupni vývoje jsou pohlavní buňky uvnitř folikulu, můžeme každý folikul rozdělit na 4 zóny (obr. 2.1). Vrchol folikulu (nejvzdálenější část od *vas efferens*) neboli germarium obsahuje spermatogonie. Zde se také u mnohých zástupců hmyzu nachází nápadná apikální buňka, která představuje zásobárnu živin pro spermatogonie. Z germaria spermatogonie sestupují níže do růstové zóny, kde dochází k jejich dalšímu dělení a růstu. Nově vzniklé dceřiné buňky zůstávají pohromadě s buňkami mateřskými a jsou obalovány epitelovitě uspořádanými buňkami cystocyty. Vytváří se tak spermio-cysta, uvnitř které mitózou vznikají spermatocyty. K dalšímu dělení (meióze) dochází v zóně maturační a spermatocyty se tak mění na spermidy. V poslední části nazývané transformační zóna se spermidy přeměňují v hotové a oplození schopné spermie (spermatozoa). Také dochází k desintegraci stěny cyst, ale i přesto spermie zůstávají pohromadě a vytváří jakýsi svazek neboli spermatozeugma (Gillot 1995, Obenberger 1952).

Spermie jsou dále posouvány peristaltickými stahy chámovodu až do semenných váčků. Semenné váčky jsou vlastně rozšířeninou chámovodu a slouží jako zásobárna zralých spermií (Gillot 1995, Horn 1978, Kovařík a kol. 2000, Obenberger 1952). Spermie jsou zde umístěny tak, že hlavička směřuje ke stěně váčku, zatímco bičíky směrem dovnitř (Obenberger 1952).

Z varlat vycházejí párové kanálkovité trubice zvané chámovody, jejichž stěna je tvořena vrstvou silného epitelu a na povrchu ohraničena bazální blanou. U většiny hmyzu se oba chámovody spojují a společně vstupují do chámometu. Jepice chámomet nemají a chámovody vyúsťují ven odděleně (Obenberger 1952).

Přídavné žlázy vyrůstají ze spodní části chámovodů či z vrchní části chámometu. Tyto žlázy produkují lepivý sekret, který je v podobě tekutiny vstříkovan přímo se spermiemi nebo vytváří lepivý obal kolem spermií zvaný spermatofor. U některých druhů mohou též produkovat látku, která při kopulaci způsobí zvýšenou produkci vajíček (Gillot 1995, Horn 1978, Obenberger 1952). Pouzdro (spermatofor) bývá po vyprázdnění obsahu v pochvě samice buď rozpuštěno a absorbováno či aktivně vypuzováno (Hůrka, Čepická 1980).

Spermie a sekrety pohlavních orgánů vycházejí při kopulaci ven přes gonopor, což je otvůrek umístěný v penisu (Obenberger 1952).



Obr. 2.1 Podélný řez folikulem varlete hmyzu (podle Obenbergera 1952)

2.2 Reprodukční soustava ploštíc

Samčí pohlavní soustava ploštíc dobře odpovídá obecným rysům stavby pohlavní soustavy hmyzu. Podle Obenbergera (1952) varle ploštíc tvoří nejméně 2 a nejvíce 8 testikulárních folikulů. Zpravidla je to ale sedm folikulů (př.: *Ilyocoris cimicoides*, *Notonecta glauca*) (Obenberger 1958). Pendergrast (1957) ovšem uvádí, že varle *Velia caprai* je tvořeno pouze jediným folikulem.

Akcesorické žlázy mohou být dvojího typu: mesadenia (vznik z mezodermu) a ectadenia (vznik z ektodermu). U různých čeledí dochází k drobným modifikacím těchto žláz (Obenberger 1958, Pendergrast 1957).

Obenberger (1958) zmiňuje, že spermie ploštíc jsou většinou mnohem delší než u jiných řádů hmyzu a největší byly zjištěny u vodní ploštice *Notonecta maculata*. Strukturou spermií u ploštíc se zabývali např. Dallas a Afzelius (1980). Tito autoři uvádějí, že stejně jako u jiných živočichů je ultrastruktura spermií ploštíc druhově rozdílná.

2.3 Reprodukční soustava a spermatogeneze vybraných vodních ploštíc

Studiem vývoje reprodukčního systému některých vodních ploštíc se zabývali v poslední době následující autoři: Papáček a Gelbič (1989) u bodule obecné (*Ilyocoris cimicoides*), Papáček a Soldán (2008) u hlubenky skryté (*Aphelocheirus aestivalis*) a Papáček a Soldán (1992) u znakoplavky obecné (*Notonecta glauca*).

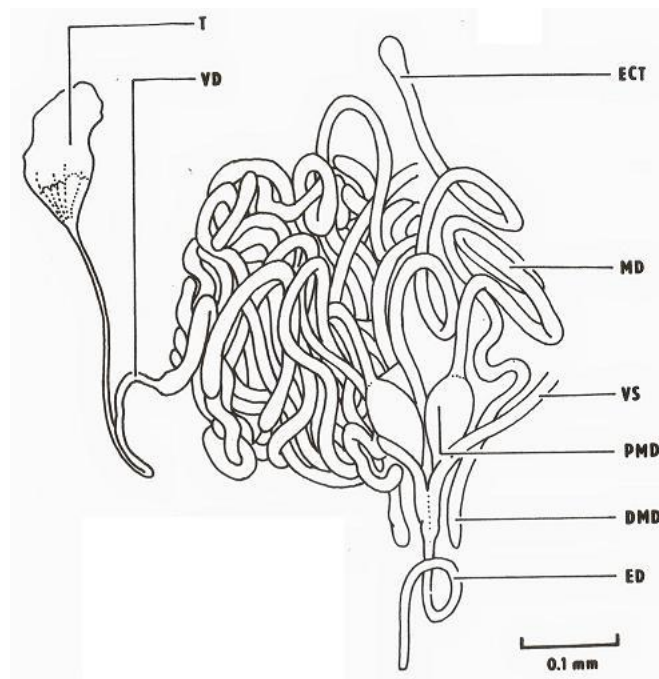
2.3.1 Bodule obecná (*Ilyocoris cimicoides*) (Heteroptera: Nepomorpha: Naucoridae)

Vývoj pohlavní soustavy samců tohoto druhu charakterizují Papáček a Gelbič (1989) následujícím způsobem: Varlata nymf 1. instaru jsou kulatá, během 2. instaru se prodlužují a obsahují především spermatogonie. U larev 3. a 4. instaru jsou pozorovatelné primární spermatocyty, které prochází meiozou, vznikají zřetelně menší sekundární spermatocyty a ty se dále dělí na spermatidy. Spermatidy se postupně prodlužují a začíná vznikat bičík. Na konci 5. instaru jsou pozorovatelné první „balíčky“ se spermii a volné spermie nalezeny v chámometu. Varlata jsou nejlépe vyvinuta u dospělců do jednoho měsíce. U jedinců starých 2 - 6 měsíců dochází k mírné

redukci varlat během páření a déle jsou velice redukována. V této době jsou folikuly prázdné a spermie se objevují v chámovodu a v semenných váčcích, kde se hromadí.

V 1. instaru jsou testikulární folikuly téměř nerozlišitelné, chámovody končí slepě v 9. abdominálním článku. Během druhého instaru se každé varle dělí na dvě skupiny folikulů (3 + 4) a ve špičce je hákovitě zakřiveno. Dochází k formování chámometu a akcesorických žláz – párového mesadenia a nepárového ektadenia. U larev 5. instaru ihned po ekdyzi získává varle tvar S a skupina 4 folikulů se stává delší než skupina folikulů tří. Postupně (u larev 5. instaru středně starých a těsně před svlékáním) varlata mění tvar ze zakřivení S na L, dvě skupiny folikulů se stávají nerozlišitelné a přídatné žlázy rostou (Papáček, Gelbič 1989).

Papáček a Gelbič (1989) také znázorňují schéma samčí pohlavní soustavy bodule obecné (viz obr. 2.2)



Obr. 2.2 Schéma samčí pohlavní soustavy *Ilyocoris cimicoides* (podle Papáčka a Gelbiče 1989). T – varle (*testis*), VD – chámovod (*vas deferens*), ECT – ektadenia, MD – mesadenia, VS – semenný váček, PMD – proximální část mesadenia, DMD – distální část mesadenia, ED – chámomet (*ejaculatory duct*)

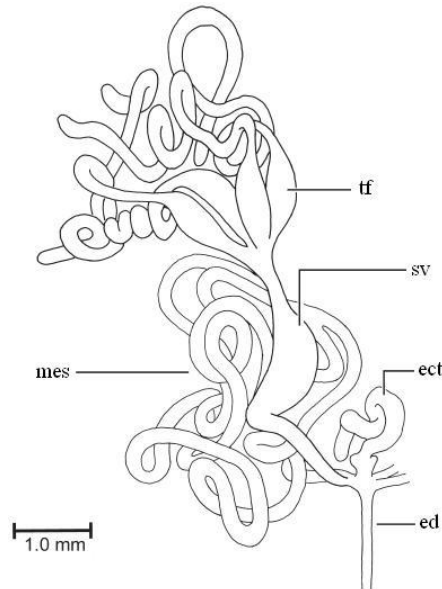
2.3.2 Hlubenka skrytá (*Aphelocheirus aestivalis*) (Heteroptera: Nepomorpha: Aphelocheiridae)

Podle Papáčka a Soldána (2008) prochází samčí pohlavní soustava následujícími ontogenetickými změnami: Varlata se stávají patrnými už v 1. instaru, kdy mají kulatý tvar bez znatelných folikulů, uvnitř se tvoří spermatogonie a folikulární buňky. Základy testikulárních folikulů jsou znatelné až ve 2. instaru a jejich diferenciaci končí ve 3. instaru, kdy se zároveň vytváří přídatné žlázy. Folikuly každého varlete jsou v tomto období rozděleny do dvou zřetelných skupin (2 + 2). Během těchto dvou stádií dochází k mitóze spermatogonií a vzniku cyst. Ve 4. instaru dochází k postupnému růstu folikulů, jejich proximální část je naplněna cystami obsahujícími spermatogonie a blízko *vasa efferentia* lze pozorovat spermatocyty ve fázi pozdního heterotypického či na počátku homeotypického meiotického dělení. V tomto instaru už není zřetelné původní rozdělení folikulů 2 + 2 a každé varle je tvořeno 4 stejně velkými testikulárními folikuly. Před metamorfózou (v 5. instaru) nastává prodlužování folikulů a svou délkou odpovídají délce folikulů dospělého samce (7,5 – 8,5 mm). Růst folikulů je spojen s rychlou spermatogenezí. Na počátku 5. instaru folikuly obsahují převážně spermatocyty (zabírají až polovinu folikulů), v jeho poslední třetině se začínají objevovat spermatidy. V době před svlečením do dospělce se nikdy neobjevují zralé spermie, ty se objevují až během dvou týdnů po ekdyzi. Spermatogeneze je ukončena v semenných váčcích, kde jsou cysty rozloženy a nejspíše resorbovány. Spermie jsou dlouhé 750 – 800 μm (i s bičíkem) a vytvářejí svazky podobné cystám (Papáček, Soldán 2008).

Během 1. instaru jsou viditelné chámovody končící slepě na zadním okraji 8. abdominálního článku. Dlouhé párové mezodermální přídatné žlázy začínají být patrné u larev 2. instaru společně s chámometem. Až během 3. instaru se objevuje krátká nepárová ektodermální přídatná žláza, zřejmě odpovídající ektadeniu u *Ilyocoris*. K nápadnému růstu akcesorických žláz dochází 2 – 3 týdny po ekdyzi (Papáček, Soldán 2008).

Způsobem reprodukce se relativně dlouhověký druh *A. aestivalis* poněkud liší od většiny vodních ploštic. Spermatogeneze je permanentní, všechny vývojové stupně samčích pohlavních buněk se vyskytují během celého roku a mají tak schopnost pářit se od jara do podzimu. Proximálně od testikulárních folikulů jsou přídatné semenné váčky. Papáček a Soldán (2008) předpokládají, že jejich přítomnost je spojena s neustálou

spermatogenezí. „Normální“ semenné vacky, vyskytující se bezne u vodních ploštic, nemají vhodnou kapacitu pro uskladnění neustálé zrajících spermíí. Schéma samčí pohlavní soustavy hlubeny skryte je znázorněno na obr. 2.3.



Obr. 2.3 Schéma samčí reprodukční soustavy *Aphelocheirus aestivalis*

(podle Papacka a Soldána 2008). tf – testikulrní folikul, sv – semenný vaek, mes – mesadenia, ect – ektadenia, ed – chámomet (*ejaculatory duct*)

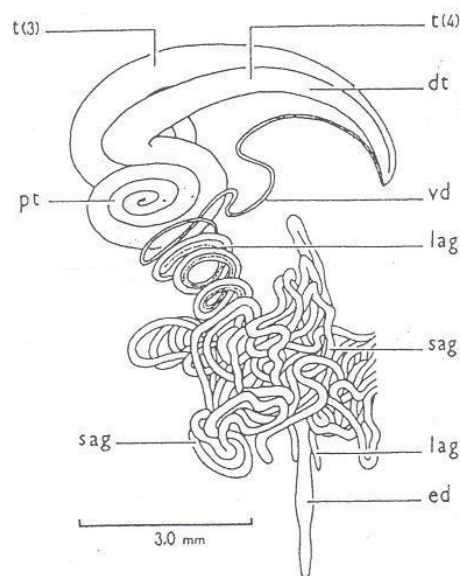
2.3.3 Znakoplavka obecná (*Notonecta glauca*) (Heteroptera: Nepomorpha: Notonectidae)

Pro ontogenezi samčí pohlavní soustavy u daného druhu Papacek a Soldán (1992) uvadejí nsledující vývojové schéma: U nymf 1. instaru jsou patrné spermatogonie, ale zatím nejsou rozlišeny folikuly, které se vytvarí až v 2. instaru. Folikul 2. instaru zaplňuje germarium obsahující sekundrní spermatogonie, dále primrní spermatogonie a cystove buňky. Apiklní buňka nebyla nalezena. Primrní spermatogonie mají kulovitý tvar, velikost 4 - 6 μm , jádro se slabe zrnitým chromatinem azpatne viditelne jádérko. Sekundrní spermatogonie velikostí i tvarem odpovidají pedchozím, ale liščí se tím,e mají barvitelné jádro a dobře rozlišitelné jádérko. Ve 3. instaru dochazí k postupně redukci germaria a ve spermiozystach se zaínají objevovat první spermatoocyty. Primrní spermatoocyty o velikosti 5 – 9 μm mají slabe barvitelné jádro, ale velmi dobře barvitelné jádérko. Sekundrní spermatoocyty jsou o něco mení (4 – 7 μm) a zaínají být zjevne během 4. instaru. V prubehu 5. instaru vznikají spermatoidy

velké 4 – 8 μm , které mají intenzivně barvitelné jádro a patrné jadérko. Mladé spermatidy mají nejdříve kulatý tvar, v druhé polovině 5. instaru získávají tvar elipsovitého a postupně začínají rychle růst do délky. V době 1 až 1,5 měsíce po metamorfóze jsou spermiocysty plné dospělých spermií (1600 μm), jejichž hlavičky jsou oproti bičíkům velmi dobře barvitelné. Nejdříve dochází k rozpadu spermiocyst na bázi folikulu, zřídka i ve vývodných cestách. Spermie potom vytvářejí svazky podobné spermiocystám (Papáček, Soldán 1992).

Každé varle se skládá ze 7 testikulárních folikulů uspořádaných do 2 skupin (4+3). Maximální délka varlat (18,0 - 21,2 mm) byla pozorována u dospělců 1,5 – 2 měsíce po ekdyzi, kdy je ukončen i podélný růst varlat (Papáček, Soldán 1992).

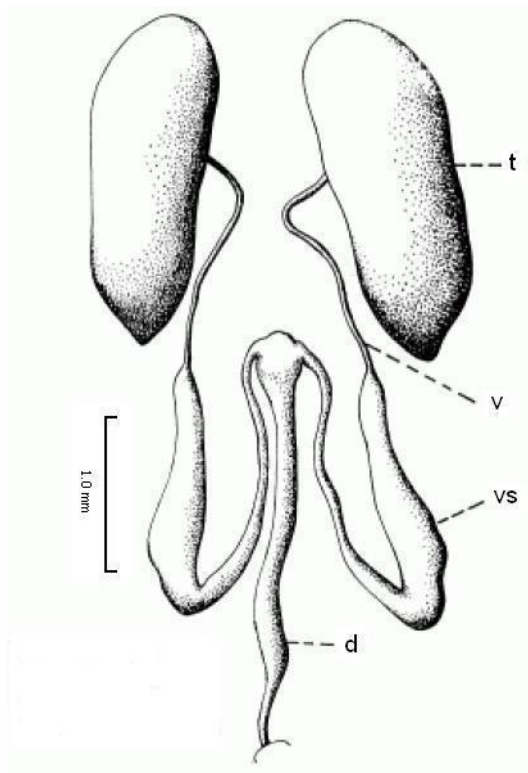
Akcesorické žlázy umístěné podél chámovodu jsou dvojího typu: dlouhé (1 + 1) a krátké (3 + 3) přídatné žlázy. U nymf 1. instaru je patrný chámovod, nikoliv přídatné žlázy a chámomet. Dlouhé akcesorické žlázy spolu s chámometem se začínají objevovat u larev 2. instaru, krátké až u 4. instaru. Celková velikost přídatných žláz během larválních stádií je menší než u samců krátce po metamorfóze (Papáček, Soldán 1992). Celkové schéma samčí pohlavní soustavy znakoplavky obecné je znázorněno na obr. 2.4.



Obr. 2.4 Schéma samčí pohlavní soustavy *Notonecta glauca* (podle Papáčka a Soldána 1992). t (3) – skupina tří testikulárních folikulů, t (4) – skupina čtyř testikulárních folikulů, dt – distální část varlat, pt – proximální část varlat, vd – chámovod (*vas deferens*), lag – dlouhé akcesorické žlázy, sag – krátké akcesorické žlázy, ed – chámomet (*ejaculatory duct*)

2.4 Reprodukční soustava hladinatky člunohřbeté (*Velia caprai*) (Heteroptera: Geromorpha: Veliidae)

Nákres samčí pohlavní soustavy *Velia caprai* zobrazuje Pendergrast (1957) (viz obr. 2.5). V poslední době se vývojem pohlavní soustavy hladinatky člunohřbeté zabýval Ditrich (2005) s využitím morfologických metod studia (nikoli histologických řezových technik). Ten například uvádí absenci přídavných žláz u samců *Velia caprai*. Jejich funkci pak nahrazuje vysoký sekreční epitel, který vystýlá zesílenou část (bulbus) chámometu a celý chámomet.



Obr. 2.5 Schéma samčí pohlavní soustavy *Velia caprai* (podle Pendergrasta 1957).

d – chámomet, t – varle, v – chámovod, vs – semenný váček

Dále autor (Ditrich 2005) charakterizuje ontogenetický vývoj samčí reprodukční soustavy druhu následujícím způsobem. Varlata *Velia caprai* jsou zřetelná už u nymf 1. instaru, mají kulovitý tvar a průměr cca 60 μm . Chámovody končí slepě terminální ampulí. U 2. instaru dochází ke značnému nárůstu varlat do délky, získávají definitivní fazolovitý tvar a jsou orientovány latero - mediálně. Během 3. instaru se varlata dále zvětšují, chámovody se napojují na chámomet a rozšířené terminální ampule se stávají

základem budoucích semenných váčků. U larev 4. a 5. instaru nedochází k velkým změnám. Varlata se zvětšují a dochází k jejich přetočení tak, že delší strana směřuje kranio – kaudálně. Varlata dospělých samců starých do ± 12 hodin po ekdyzi se příliš neliší od varlat nymf 5. instaru. V tomto období dochází k prodlužování chámovodů a roste chámomet. U dospělých samců 7 dnů po ekdyzi a 25 dnů po ekdyzi rostou varlata a chámovody. Velký růst šířky semenných váčků a chámometu byl zjištěn u samců 42 dnů po ekdyzi, což spolehlivě poukazuje na pohlavní zralost. Největší rozměry mají varlata dospělců starých 4 – 6 týdnů, kdy samci dosahují úplné pohlavní zralosti.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Studovaný druh

Hladinatka člunohřbetá *Velia caprai* Tamanini, 1947 (Heteroptera: Gerromorpha: Veliidae) je semiakvatická dravá ploštice. Pro pohyb po hladině využívá především střední pár noh, přední pár slouží k uchvácení kořisti (Obenberger 1958). *Velia caprai* je dravá ploštice nejčastěji se živící drobným hmyzem spadlým na hladinu. Dále její potravu tvoří vodní hmyz, planktonní korýši, nymfy ostatních semiakvatických ploštic či nymfy vlastního druhu. Jedinci tohoto druhu mohou přežít dvě zimní období, možná i celou další sezonu (Ditrich, Papáček 2008). Přezimují buď jako dospělci nebo ve stadiu vajíček. Toto je situace velmi vzácná nejen v infrařádu Gerromorpha, ale obecně u hmyzu (Ditrich, Papáček 2009). Areál rozšíření *Velia caprai*, který je omezen na Evropu a sahá od Řecka po Švédsko, je svou velikostí spíše průměrný (Ditrich, Papáček 2008).

V Evropě byl výskyt druhu prokázán konkrétně v následujících zemích: Andorra, Belgie, Česká republika, Dánsko, Francie, Holandsko, Irsko, Itálie, Jugoslávie, Lichtenštejnsko, Lucembursko, Maďarsko, Německo, Norsko, Polsko, Portugalsko, Rakousko, Rumunsko, Řecko, Slovensko, Španělsko, Švédsko, Švýcarsko a Velká Británie (Andersen 1995).

3.2 Chovy a lokality sběru materiálu

Byly založeny tři chovy značené jako chov B, M a P (viz dále). Jelikož hlavním cílem diplomové práce je zjistit, jak probíhá spermatogeneze u dospělců *Velia caprai*, bylo nutné mít k dispozici dospělé jedince přesně definovaného stáří. V těchto chovech byli chováni v sérii akvárií a sklenic dospělci stejného stáří.

Materiál (starší nymfy hladinatky) do chovů byl sbírán na několika místech. Většina hladinatek *Velia caprai* (celý chov B a M) pocházela z potoka nedaleko vesnice Třebín, který se vlévá do Homolského rybníka (souřadnice 48°57'36.197''N; 14°23'39.762''E). Tato oblast se nachází jižně od Českých Budějovic, v nadmořské výšce 410 m n.m. s průměrnou roční teplotou 8,2°C. Chov P byl získán odchytů z jedné lokality v oblasti Baronova mostu v Novohradských horách (48°37'32.255''N, 14°39'31.52''E).

Chovy B a M byly založeny z nymf 4. a 5. instaru přenesených z terénu ve dnech 25. 6. a 30. 6. 2009. Zpočátku byly nymfy z obou sběrných dnů ve dvou různých akváriích. Postupem času, kdy docházelo k úbytku nymf z důvodu svlékání do stadia dospělců (= AD), byly nymfy z obou akvárií dány do akvária jednoho. Nymfy chovu P byly chovány ve třech akváriích a nesjednocovány. Po svlečení nymf do stadia dospělců byli víceméně stejnověcí AD přemístěni do sklenic/menších akvárií a chování po skupinách stejného absolutního stáří – měřeno ve dnech od poslední ekdyze. Kontrola akvária(i) s nymfami, odebírání právě svlečených dospělců a jejich přemístování do sklenic ve skupinách jedinců stejného věku bylo prováděno každý den. Každá sklenice/akvárium se stejnověkými jedinci byla okamžitě označována následujícími údaji: datum poslední ekdyze a počet dospělců daný den svlečených (samci a samice byli chováni společně, aby byly zachovány podmínky pro možnost kopulace). Z chovů pak byli AD jedinci známého stáří odebírání pro potřebu preparace pohlavních orgánů. Jedinci, kteří zbyli (nebyli usmrceni z důvodu preparace či neuhynuli), byli v chovu ponecháni pro přezimování.

Chovy byly vedeny ve třech variantách značených jako chov B, chov M a chov P. Každá varianta byla vedena jinou osobou a vzájemně v mírně odlišných podmínkách.

3.2.1 Chov B (vedla Lucie Bělinová)

První odchyt byl proveden 25. 6. 2009 a bylo odchyceno kolem 80 jedinců, ze kterých však do druhého dne po transportu z terénu přežilo pouhých 43 kusů. Při druhém odchytu 30. 6. 2009 bylo získáno 52 kusů. Celkový výchozí počet jedinců pro tento chov byl tedy 95 nymf *Velia caprai*.

Pro chov nymf byla použita 2 akvária: první mělo půdorys 18 x 42 cm a výšku 25 cm, druhé 18 x 25 cm a 18 cm (rozdělení nymf do dvou akvárií mělo důvod pouze v tom, aby měly dostatek prostoru). Sklenice, do kterých byli umísťováni dospělí jedinci ihned po svlečení, měly průměr 7 - 15 cm a výšku 12 - 24 cm. V jednotlivých sklenicích bylo 1 – 16 jedinců v závislosti na velikosti chovné sklenice. Akvária, ale i sklenice byly vždy plněny pitnou vodou do výšky 2 – 5 cm. Voda byla měněna po 1 – 5 dnech dle toho, jaká byla teplota a znečištění vody. Do sklenic a akvárií byly vkládány polystyrénové destičky o průměrných rozměrech 4 x 3 cm, které sloužily jako břeh (jejich počet závisel na velikosti sklenice či akvária). Akvária i sklenice s hladinatkami byly umístěny ve stinné části pokoje a průměrné teploty se pohybovaly

kolem 25°C. Nymfy i dospělci tohoto chovu byli krmeni více (častěji i větším množstvím), než v případě chovu M a P.

Nymfy byly krmeny každý den různými druhy z řádu dvoukřídlí (Diptera), kde převažovaly: bzučivka obecná (*Calliphora vicina*), bzučivka zlatolesklá (*Lucilia sericata*), moucha domácí (*Musca domestica*) a ojediněle tiplice obrovská (*Tipula maxima*). Do akvária byly zpočátku obden házeny 2 – 4 kusy, postupem času, jak nymfy ubývaly (z důvodu svlečení se do dospělců) pouze 1 – 2 kusy.

Dospělé hladinatky byly krmeny převážně octomilkami (*Sophophora* sp.), ale také dalšími druhy hmyzu - bzučivka obecná (*Calliphora vicina*), bzučivka zlatolesklá (*Lucilia sericata*) a moucha domácí (*Musca domestica*). Dospělci byli krmeni 1x za dva až tři dny (červenec 2009), počátkem srpna přestali o potravu projevovat zájem (nenapadali vhozený hmyz) a doba mezi jednotlivými krmeními se protáhla až na jeden týden (málokdy však bylo pozorováno, že by se o potravu zajímali). K častějšímu krmení opět došlo od 9. 9 – 30. 9. 2009. Od konce září byli zbylí dospělci umístěni do jednoho akvária. Toto akvárium o rozměrech 15 x 23 cm (půdorys) a 15 cm (výška) bylo plněno vodou do výšky 2 – 3 cm. Voda byla vyměňována 1x za 7 – 14 dnů, dle toho, jaká byla míra jejího znečištění. V akváriu tvořil břeh mech. Hladinatky *Velia caprai*, přinesené z domácího chovu, byly ve skleníku krmeny už pouze octomilkami (*Sophophora* sp.). Chov byl 30. 9. 2009 přemístěn do skleníku na fakultě (PF JU) a dospělci byli krmeni 1x týdně. Teplota ve skleníku se v průměru pohybovala v rozmezí 13 -15°C.

3.2.2 Chov M (vedla Karolína Málková)

První odchyt byl proveden 25. 6. 2009 a bylo odchyceno 43 nymf, ze kterých však do 30. 6. 2009 zbylo po úhynech pouhých 26 kusů. Při druhém odchytu 30. 6. 2009 bylo získáno 68 nymf, z nichž do druhého dne po transportu 29 nepřežilo. Celkový výchozí počet pro tento chov byl tedy 95 nymf *Velia caprai* 4. a převážně 5. instaru.

Pro chov nymf byla použita 2 skleněná akvária o rozměrech 23 x 15 cm (půdorys) a 15 cm (výška). Dospělí jedinci po svlečení byli odebíráni a umístováni do sklenic, které měly průměr 8 – 11 cm a výšku 12 – 15 cm. Do sklenic a akvárií byla nalévána pitná voda do výšky 3 – 4 cm. Voda byla měněna po 3 – 5 dnech. Jako břeh

a odpočinkové místo pro hladinatky sloužily kusy polystyrenu. Do akvárií byly použity polystyrenové destičky o průměrném rozměru 3 x 5 cm, do sklenic o rozměrech 2 x 3 cm. Všechny chovné nádoby (sklenice i akvária) byly umístěny v místnosti v blízkosti okna směřujícího na východ, kam přímé světlo pronikalo pouze v dopoledních hodinách. Průměrná teplota místnosti se pohybovala okolo 20 – 24°C.

Nymfy i dospělci byli krmeni dvoukřídlym hmyzem (Diptera) následujících druhů: octomilka (*Sophophora* sp.), moucha domácí (*Musca domestica*), bzučivka obecná (*Calliphora vicina*), bzučivka zlatá (*Lucilia caesar*), masařka obecná (*Sarcophaga carnaria*), popř. tiplice obrovská (*Tipula maxima*).

Krmení u nymf probíhalo každé 2 - 3 dny, kdy do akvária byly vhozeny 2 – 3 kusy dvoukřídleho hmyzu či několik kusů octomilek.

Dospělci byli zpočátku (červenec 2009) krmeni po 3 – 6 dnech. Do jednotlivých sklenic byly házeny 1 – 2 kusy dvoukřídleho hmyzu či několik kusů octomilek (v závislosti na počtu jedinců ve sklenici). Stejně jako u chovu B byl v srpnu 2009 pozorován pokles zájmu ploštic o potravu a krmení tak probíhalo maximálně 1x za týden. V tomto období byl příjem potravy pozorován jen výjimečně. K častějšímu krmení došlo až v období 9. 9 – 30. 9. 2009, kdy byly hladinatky krmeny znovu v rozmezí 3 – 6 dnů. I v tomto případě byli v následujících měsících zbylí dospělci přendáni do jednoho akvária, 30. 9. 2009 přemístěni do skleníku na fakultě (PF JU) a krmeni 1x týdně. Od té doby byly podmínky chovů B a M stejné, blíže jsou popsány výše v kapitole 3.2.1.

3.2.3 Chov P (vedl vedoucí diplomové práce)

Výchozím materiálem pro tento chov bylo celkem 150 nymf 4. a 5. instaru odchycených v na lokalitě u Baronova mostu v Novohradských horách. Nymfy byly chovány za srovnatelných podmínek ve třech akváriích (v každém 50 kusů) o stejných rozměrech (30 x 50 x 25 cm). Bezprostředně po svlečení do stadia dospělců byli jedinci odebíráni a podle věkových kohort přenášeni do menších akvárií (15 x 10 x 10 cm). Akvária s nymfami i dospělci byla plněna vodou do výšky 5 cm, jako umělý břeh sloužil rašeliník. Teplota vzduchu se pohybovala v rozmezí 15 - 18°C. Částečné zastínění imitovalo podmínky hladiny potoka v podrostu, kde byly nymfy chytány. Krmení probíhalo 1x za 3 dny různými druhy komárů a pakomárů a směsí nasmýkaného

drobného hmyzu (většinou Diptera, Sternorrhyncha, Auchenorrhyncha). Údaje o věku dospělců v akváriích byly vždy zaznamenány přímo na stěnu příslušného akvária.

3.3 Přezimování jedinců v chovech

Počátkem prosince, kdy se teploty trvaleji dostávaly pod bod mrazu, byly některé chovy přesunuty do termoboxu. Jednalo se o chov B a M. Akvária byla naplněna vodou do výšky 2 – 3 cm. Teplota se v termoboxu pohybovala kolem 0°C a dospělci zde byli ponecháni pro přezimování (nebyli tedy ani krmeni). V polovině února 2010 bylo ovšem zjištěno, že všichni jedinci v daných podmínkách termoboxu uhynuli.

3.4 Materiál z terénu odebíraný pro preparaci varlat a sledování spermatogeneze

Tento materiál byl pořízen vedoucím diplomové práce v oblasti Novohradských hor. Byli sbíráni dospělci nedefinovaného stáří. Dospělci byli buď v den odchytu smrceni a preparováni či po určitý čas ponecháni v chladné zastíněné místnosti/ledničce. Značení jedinců v kapitole 3.5 viz tab. 3.II.

3.5 Fixace a preparace

Z chovu 1 byli odebíráni dospělí jedinci v přesných časových intervalech (\pm 12hodin), tj. definovaného stáří:

do 1 dne po svlečení

7 dnů po svlečení

14 dnů po svlečení

25 dnů po svlečení

42 dnů po svlečení

60 dnů po svlečení

Původním záměrem bylo pro každý časový interval odebrat 6 kusů z každého chovu (B, M, P) a to vždy 3 ♂ a 3 ♀. Tento systém byl částečně zachován, ale v případě některých odběrů musel být pozměněn pro nedostatek jedinců některého pohlaví (viz tab. 3.I).

Tab. 3.I Přehled materiálu dospělců z chovů, jejich odběrů a značení pro účely preparace gonád. **m** = ♂, **f** = ♀, **B** = chov B, **M** = chov M, **P** = chov P, **L5** = larvy 5. instar, číslovky **1 – 60** před těmito zkratkami určují přesné stáří jedinců ve dnech (od svlečení do odchyty).

	počty odběrů Lucie Bělinové	počty odběrů Karolíny Málkové	počty odběrů vedoucí DP
5. instar	∅	∅	3x L5mP , 1x L5fP
Do 1 dne po ekdyzi	5x 1mB , 3x 1fB	1x 1mM , 3x 1fM	∅, 4x 1fP
7 dnů po ekdyzi	6x 7mB , 6x 7fB	∅	∅, 4x 7fP
14 dnů po ekdyzi	∅	6x 14mM , 6x 14fM	2x 14mP , 2x 14fP
25 dnů po ekdyzi	3x 25mB , 3x 25fB	3x 25mM , 3x 25fM	5x 25mP , 1x 25fP
42 dnů po ekdyzi	3x 42mB , 3x 42fB	3x 42mM , 3x 42fM	2x 42mP , 5x 42fP
60 dnů po ekdyzi	6x 60mB , 3x 60fB	∅, 3x 60fM	∅, 1x 60fP

Dále byli vedoucím diplomové práce chytáni a preparováni dospělí samci z terénu z Novohradských hor (viz tab. 3.II). Jejich varlata byla dále využita pro sledování spermatogeneze jedinců nedefinovaného stáří z terénu.

Tab. 3.II Přehled materiálu dospělců z Novohradských hor

4x ADmOv	chytáni a preparováni 6. 4. 2009
4x Am	chytáni 24.11.09; preparováni 12.1.2010
7x ADmP	chytáni a preparováni 10. 9. 2009
3x ARmP	chytáni 10. 9. 09; preparováni 26. 11. 09
3x AFAm	chytáni 24. 11. 09; preparováni 29. 11. 09

Ke smrcení dospělců a následné preparaci gonád docházelo dvojím způsobem:

- 1) Hladinatky *Velia caprai* byly usmrceny ve výparech octanu ethylnatého a poté ihned pitvány ve fyziologickém roztoku (roztok 0,9% NaCl).

2) U většiny hladinatek *Velia caprai* byla pro usmrcení a fixování použita Bouinova fixáž. Varlata těchto jedinců pak byla preparována v 96% ethanolu.

Každý jedinec byl fixován v samostatné ependorfce. Aby nedošlo k záměně, byli jedinci okamžitě při tomto úkonu značeni (pohlaví, druh, stáří, datum odběru), a to pro jistotu i dvojnásobným způsobem. Značen byl lihovým značkovačem povrch ependorfky a mikrotužkou lístek, který byl vložen dovnitř ependorfky. Zapisované údaje byly totožné.

Varlata jednotlivých samců byla vkládána do ependorfeček (plněných Bouinovou fixáží), na jejichž povrch byla napsána značka (viz Tab. 3.I) lihovým fixem. Ependorfky byly dávány po 1 – 4 kusech do sáčku a k nim přidán lísteček s duplikátním označením. Do sáčku byly ukládány ependorfky s varlaty stejně starých jedinců a jedinců ze stejného chovu, tzn. buď z chovu B či z chovu M.

K preparaci samců hladinatky *Velia caprai* byla použita stereolupa, ostré pinzety, Petriho misky různých velikostí a již zmíněné roztoky. S živými i usmrcenými jedinci bylo manipulováno pomocí entomologické pinzety.

3.6 Příprava histologických preparátů varlat

Z vypreparovaných varlat fixovaných v Bouinově fixáži byly připraveny řezové histologické preparáty. Přičemž vypreparovaná fixovaná varlata byla postupně zalita do paraplastu, paraplastové bločky byly na mikrotomu nařezány, řezy nabarveny a zality. Takto byl připraven jejich trvalý preparát.

3.6.1 Zalévání vzorků

Před zaléváním byla varlata 3x po 30 minutách promyta v 70% ethanolu. Poté byla dehydratována v sérii 2x 30 min v 96% ethanolu, 2x 20 min v 100% ethanolu a 2x 20 min v chloroformu. Varlata byla promývána a dehydratována v ependorfkách. Pro lepší manipulaci byly z ependorfeček odstraněny lístečky se značením a nahrazeny samolepkou na víčku ependorfky, na které bylo příslušné značení. Kapalina (ethanol či chloroform) byla měněna pomocí skleněných kapátek a ependorfky byly po dobu

promývání či dehydratace umístěny na rotační inkubátor s nástavci. Vše bylo prováděno při pokojové teplotě.

Po dokončení procesu dehydratace byl odsát chloroform, varlata vložena do plastové formy pro zalévání vzorků tkání (dále jen forma), a ta označena příslušnou značkou pomocí lihového fixu. Varlata byla zalita roztaveným paraplastem SIGMA a forma uložena přes noc do sušárny při teplotě 58°C (aby mohl roztavený paraplast proniknout do tkáně). Formy byly druhý den ráno postupně vyndavány, varlata pomocí nažhavené jehly narovnána do pozice potřebné pro řezání a po několik dní ponechána při pokojové teplotě, aby došlo ke ztuhnutí paraplastu.

3.6.2 Řezání

Paraplast s varlaty byl vymačkán z formy, připevněn na dřevěné bločky a ty popsány lihovou fixou příslušnou značkou. Řezání probíhalo na mikrotomu Leica (Rotační Mikrotom Leica RM 2235). Řezy o šířce 8 μm se spojovaly na pásy a pomocí pinzety byly přeneseny na podložní sklíčka Super Frost Plus (25 x 75 x 1 mm), která byla pokryta vodou. Sklíčko s řezy a vodou bylo položeno na plotýnku a po krátké době byla voda kapátkem odsáta. Sklíčka byla opět pomocí obyčejné tužky popsána značkou a na 48 hodin ponechána na plotýnce rozehřáté na 37°C. Poté byla sklíčka do doby barvení umístěna do lednice.

3.6.3 Barvení a příprava trvalých preparátů

Před přípravou trvalých preparátů byly vzorky deparafinovány, obarveny a nakonec odvodněny ve skleněných kyvetách. Postup viz tab. 3.III.

Tab. 3.III Postup barvení trvalých preparátů

	použité chemikálie	počet opakování	čas
deparafinace	xylol	2x	10 min
	96% ethanol	1x	5 min
	70% ethanol	1x	5 min
	destilovaná voda	1x	5 min
barvení	ponceau-kyselý fuchsin	1x	3 min
	destilovaná voda	2x	1 min
	1% kys. fosfomolybdenová	1x	5 min
	destilovaná voda	1x	1 min
	směs MALLORY	1x	7-8 min
	destilovaná voda	3x	1 min
dehydratace	70% ethanol	1x	3 min
	96% ethanol	1x	3 min
	100% ethanol	1x	3 min
	xylol	2x	5 min

Příprava chemikálií na barvení:

Červený roztok (ponceau-kyselý fuchsin) byl připraven smícháním 0,1 g Ponceau de xylidine, 0,2 g kyselého fuchsinu, 294 ml destilované vody a 6 ml ledové kyseliny octové.

Žlutý roztok (1% kyselina fosfomolybdenová) byl připraven z 1 g kyseliny fosfomolybdenové rozpuštěním ve 100 ml destilované vody. Roztok byl přefiltrován.

Modrý roztok (směs MALLORY) byl připraven z 0,5 g anilinové modři, 1 g oranže G, 2 g kyseliny šťavelové a 100 ml destilované vody. Po smíchání uvedených složek byl roztok 5 minut povařen a vychlazený používán.

Po obarvení byly preparáty postupně zalévány zalévacím médiem DPX pro histologii, překryty krycím sklíčkem (24 x 60 mm), ponechány 48 hodin na podložce pro zaschnutí a uloženy do krabic.

3.7 Studium, vyhodnocování a dokumentace preparátů

Trvalé preparáty řezů samčí pohlavní soustavy byly studovány pod mikroskopem Olympus BX41. Buňky spermatogeneze byly rozlišovány v měřítku: spermatogonie, primární spermatocyty, sekundární spermatocyty (prespermie), spermatidy, spermie. Kromě nich byly okrajově sledovány i tkáně stěn reprodukční soustavy – bez kategorizace. Fotografická dokumentace byla pořízena na tomtéž mikroskopu s využitím fotoaparátu Olympus CAMEDIA c-4040ZOOM. Fotografie byly zpracovány programem Zoner Photo Studio 12.

3.8 Terminologie a zkratky užívané v obrázcích

Užívaná terminologie je jednak pro studie tohoto typu vžitá a její přehled je např. uváděn Papáčkem a Soldánem (2008).

Pro označení jednotlivých typů buněk a dalších struktur v obrázcích (fotografiích) byly použity následující zkratky:

g – germarium

sp I – primární spermatocyty

sp II – sekundární spermatocyty

st – spermatidy

sm – spermie

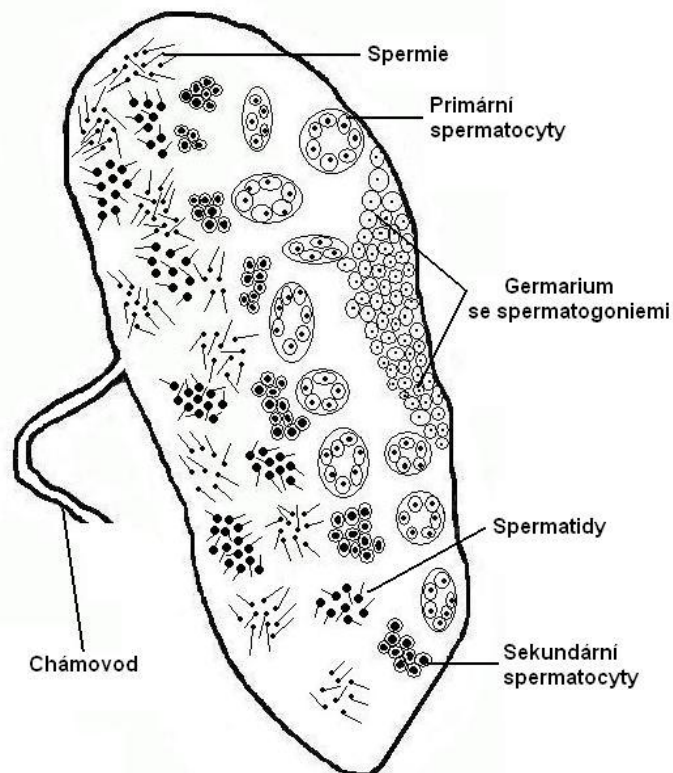
se – sekreční epitel

vb – vnější vazivová blána

4 VÝSLEDKY

4.1 Stavba a orientace varlete; poloha germaria

Varle samců *Velia caprai* je v rámci známých situací u vodních ploštic i hmyzu obecně poměrně atypické. Je jednak tvořeno jediným testikulárním folikulem a tento folikulus je širší než je dlouhý; má podobu nepravidelně elipsoidní cisterny. Germarium a vrchol testiculárního folikulu jsou reprezentovány oblastí při ploše folikulu protilehlé ústí chámovodu (viz obr. 4.1). Tato oblast je homologická proximální části testikulárních folikulů u samců ostatních ploštic. (Pokud bychom tedy posuzovali histologické řezy varlete samců *V. caprai* striktně podle situace známé u ostatních vodních ploštic, usoudili bychom, že je germarium lokalizováno „laterálně“ nikoli ve standardní poloze, tj. apikálně v trubicovitém testikulárním folikulu).



Obr. 4.1 Schéma podélného řezu varletem a proximální částí chámovodu.

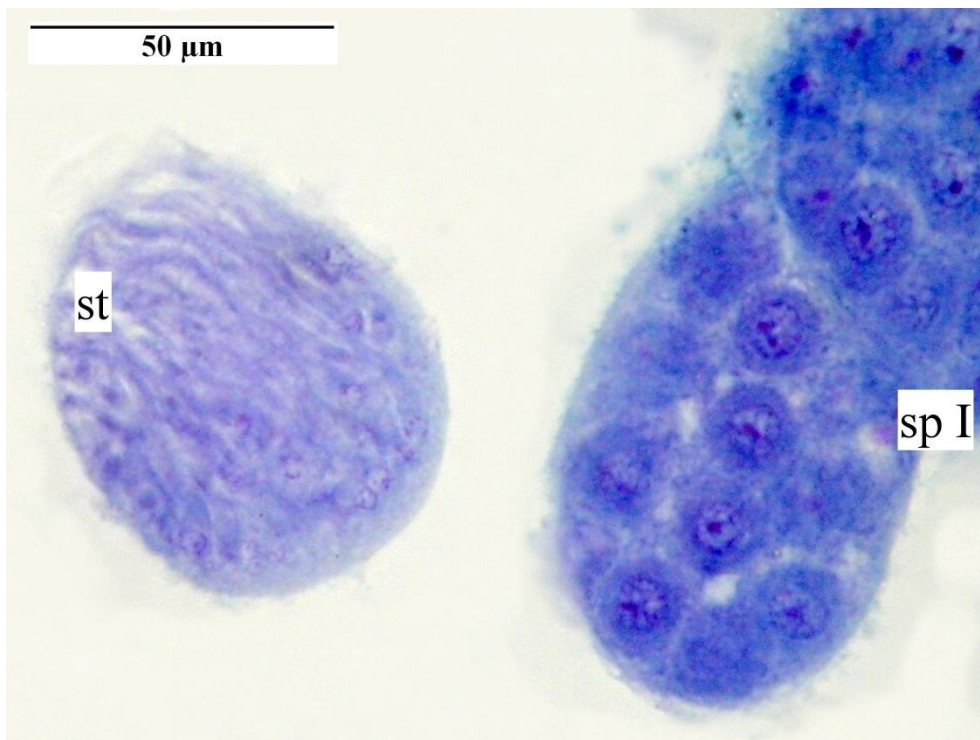
4.2 Spermatogeneze u nymf 5. instaru a dospělců různého stáří

4.2.1 Nymfy 5. instaru

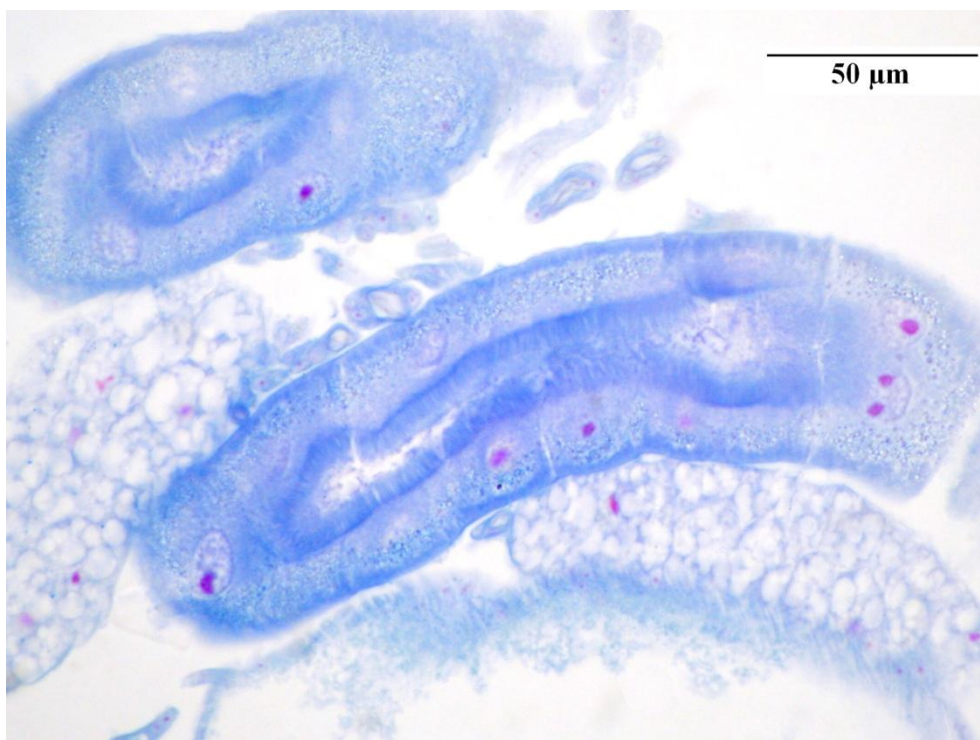
U nymf 5. instaru (chov P; 3 jedinci; L5m) byly na řezových mikropreparátech nalezeny spermatogonie lokalizované zcela ohraničeně jen v germariu (obr. 4.2). Celkově převažují primární spermatocyty, sekundárních spermatocytů bylo pozorováno malé množství. Na všech řezech byly nalezeny pouze dvě cysty se spermatidami (obr. 4.3). Zralé spermie nebyly u nymf 5. instaru zjištěny. Na podélném řezu chámovodem je vidět, že je prázdný, bez spermií (obr. 4.4).



Obr. 4.2 Řez varletem samčí nymfy 5. instaru (zkratky viz kap. 3.8).



Obr. 4.3 Spermatidy a primární spermatocyty ve varlatech samčí nymfy 5. instaru.



Obr. 4.4 Podélný a šikmý řez chámovodem samčí nymfy 5. instaru.

4.2.2 Dospělci definovaného stáří

4.2.2.1 Dospělci do 1 dne po ekdyzi

Byl sledován stav spermatogeneze u dospělců \pm 12 hodin po ekdyzi pouze z chovu B, 5 kusů a z chovu M, 1 kus; 1m. Samci z chovu B měli plná tmavá střeva indikující potravní aktivitu, pod stereomikroskopem měli zřetelně rozlišitelné semenné váčky. Samec z chovu M měl střevo prázdné a semenné váčky morfologicky zřetelně rozlišitelné. Na řezových mikropreparátech byly zastoupeny všechny buňky spermatogeneze (obr. 4.5) včetně spermií (obr. 4.6). Většinu tvořily převážně primární spermatocyty. Nebyl zjištěn významný rozdíl mezi stavem spermatogeneze u samců z chovu B a M. V řezech varlete samce z chovu M bylo pozorováno relativně velké množství spermatid a spermií. Tato situace (spermatogeneze samců z chovu M) však odpovídala variabilitě v rámci rozdílů mezi jednotlivými řezy a mezi situací u jednotlivých jedinců z chovu B. Stav spermatogeneze u samce s prázdným střevem (M) se nelišil od stavu spermatogeneze u „sytých“ samců (B).

4.2.2.2 Dospělci do 7 dnů po ekdyzi

U samců (pouze z chovu B, 6 jedinců; 7m) byla při preparaci zjištěna plná střeva. Jejich semenné váčky byly morfologicky rozlišitelné. Na řezech varlat byly pozorovány všechny typy buněk spermatogeneze (obr. 4.7, obr 4.8).

4.2.2.3 Dospělci do 14 dnů po ekdyzi

Spermatogeneze byla studována u jedinců 14 dnů po ekdyzi z chovů M (6 kusů) a P (2 kusy); (14m).

U jednoho samce z chovu P nebyla vyvinuta varlata; byly zjištěny pouze jejich rudimenty. Semenné váčky nebyly rozlišitelné ani u jednoho z preparovaných samců. Samci z chovu M byli makroskopicky habituálně „hubení“ a měli (až na jednoho) střevo prázdné. U třech z nich bylo pozorováno, že pravé varle je položeno kaudálněji, než levé. Dva z těchto samců neměli rozlišitelné semenné váčky, třetí ano. Zbylí tři samci, kteří měli varlata umístěna víceméně symetricky v odpovídající si poloze, měli zřetelně rozlišitelné semenné váčky.

V případě varlat všech studovaných jedinců (kromě z chovu P s nevyvinutými varlaty) byly pozorovány všechny typy buněk spermatogeneze (obr. 4.9). U samců z chovu M bylo zjištěno na histologických řezech relativně větší množství spermií než v případě varlat samce z chovu P. U samce z chovu P převažovaly v ploše řezů primární spermatocyty. Spermie, stejně jako u ostatních věkových stádií, vytváří často shluky (obr. 4.10).

4.2.2.4 Dospělci do 25 dnů po ekdyzi

Byla studována histologie varlat jedinců ze všech založených chovů (B, 3 jedinci; M, 3 jedinci; P, 5 jedinců; 25m). U různých jedinců z chovu P byla varlata nestejně velká a nesymetricky uložená a semenné vajíčky morfologicky pod stereomikroskopem (při preparaci) nezjistitelné. Samci z chovu B měli plné střevo; samci z chovu M střevo téměř prázdné. Samci z obou chovů (B a M) měli rozlišitelné semenné vajíčky. Velice dobře patrné germarium se spermatogoniemi (obr. 4.11), spermatocyty, spermatidy i spermie (obr. 4.12). V zastoupení a relativních proporcích různých buněk spermatogeneze se řezové mikropreparáty varlat jedinců z různých chovů nelišily. U všech převažovaly spermatidy a spermie.

4.2.2.5 Dospělci 42 dnů po ekdyzi

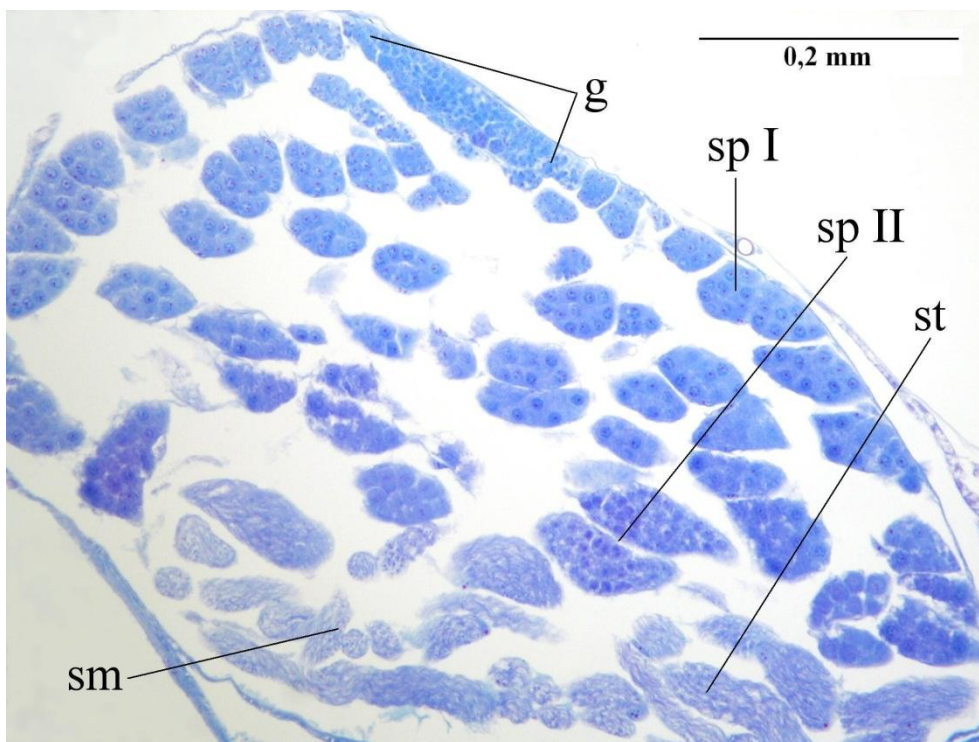
Byla studována histologie varlat jedinců ze všech tří chovů (B, 3 jedinci; M, 3 jedinci; P, 2 jedinci; 42m). U samců chovu B bylo už makroskopicky habituelně patrné, že byli více krmení a jsou robustnější než samci chovu M. Všichni samci měli morfologicky viditelné semenné vajíčky. Jeden samec z chovu M měl levé varle menší než pravé.

U jednoho samce chovu P se začíná plnit jeden ze semenných vajíček, u druhého byly oba semenné vajíčky prázdné.

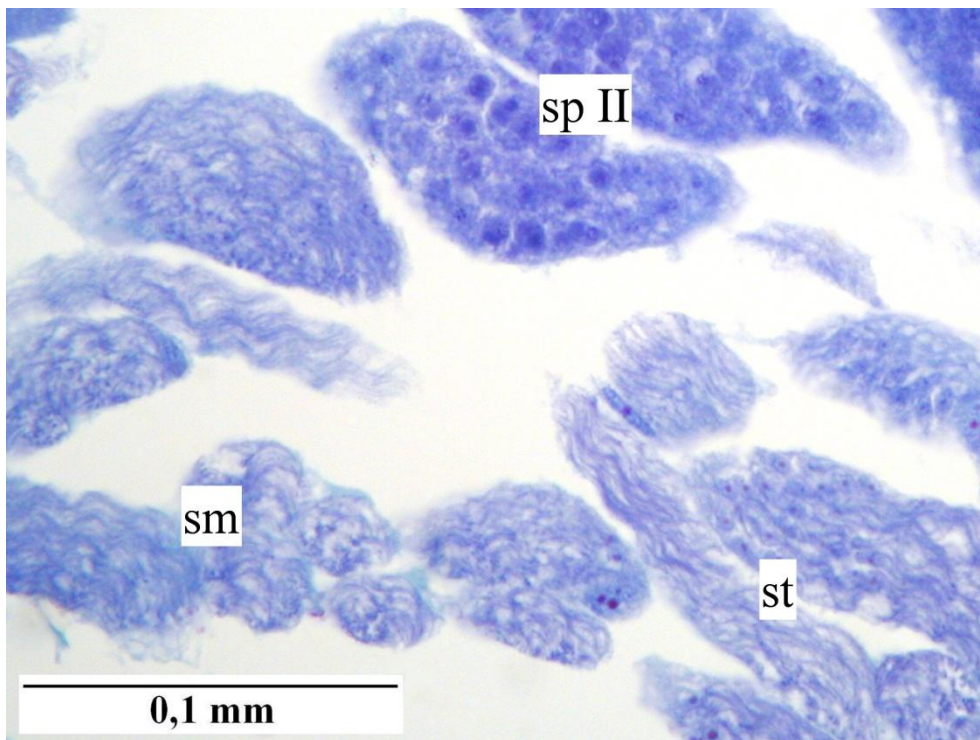
Ve varlatech všech studovaných jedinců ze všech chovů převažovaly spermatidy a spermie (obr. 4.13). Mezi jednotlivými jedinci v rámci jednoho chovu ani při srovnání jedinců z různých chovů nebyly zjištěny podstatné rozdíly.

4.2.2.6 Dospělci 60 dnů po ekdyzi

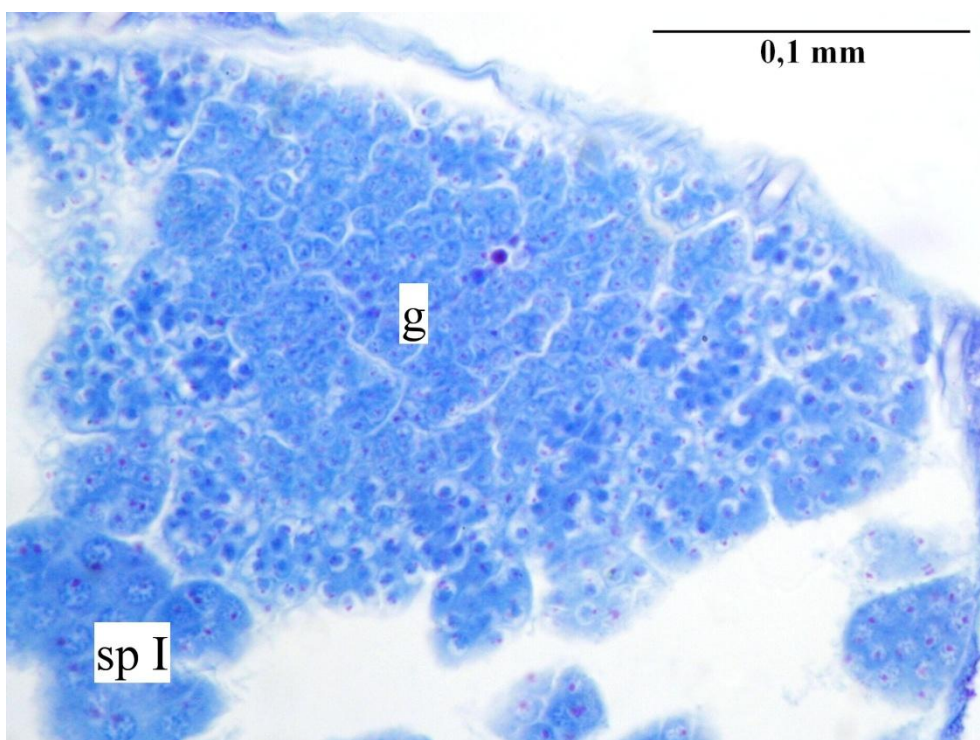
Byla studována spermatogeneze pouze u samců z chovu B (6 kusů; 60m). Tři samci měli střevo plné a tři střevo téměř prázdné. Jeden ze samců měl různě velká varlata. U všech samců byly zřetelně patrné semenné vāčky. Ve varlatech byly zjištěny spermatogonie (obr. 4.14), velké množství primárních spermatocytů, sekundární spermatocyty a relativně velké množství spermatid a spermii (obr. 4.15).



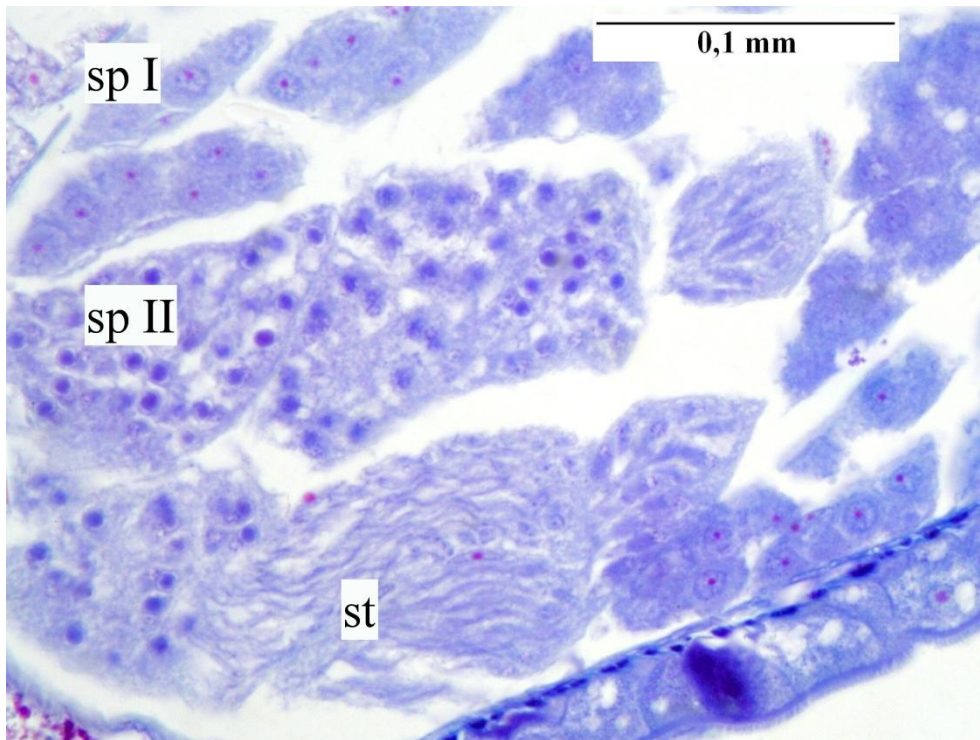
Obr. 4.5 Řez varletem samce 1 den po ekdyzi (zkratky viz kap. 3.8).



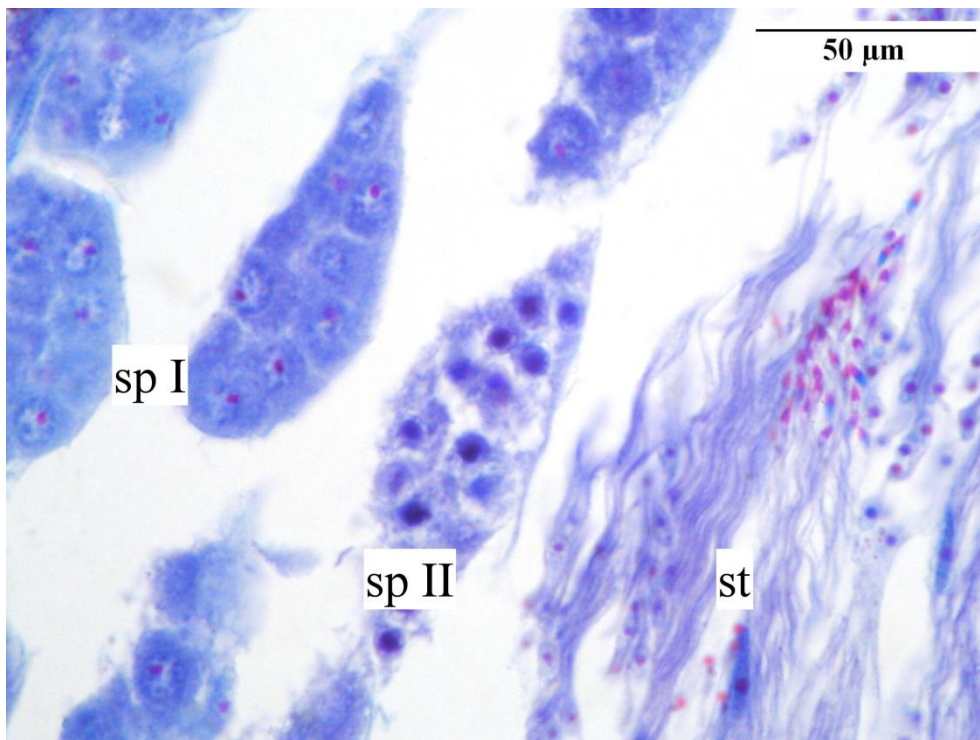
Obr. 4.6 Spermie a další typy buněk spermatogeneze ve varleti samců 1 den po ekdyzi.



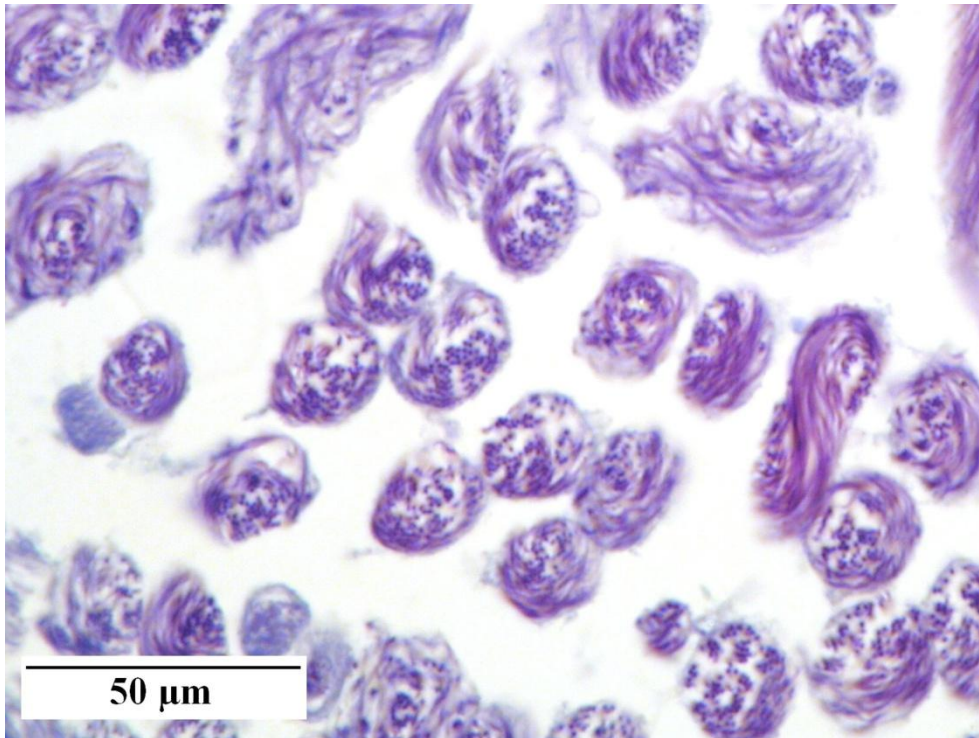
Obr. 4.7 Řez oblastí germaria testikulárního folikulu u samce 7 dnů po ekdyzi.



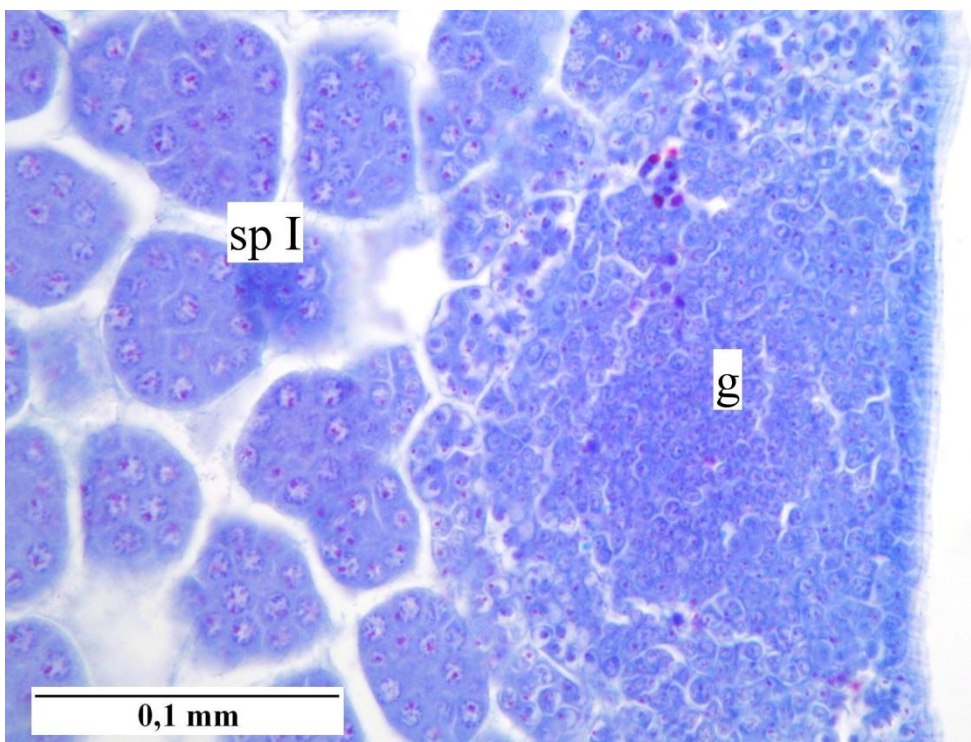
Obr. 4.8 Spermatocyty a spermatidy ve varlatech samce 7 dnů po ekdyzi (spermie mimo zorné pole snímku).



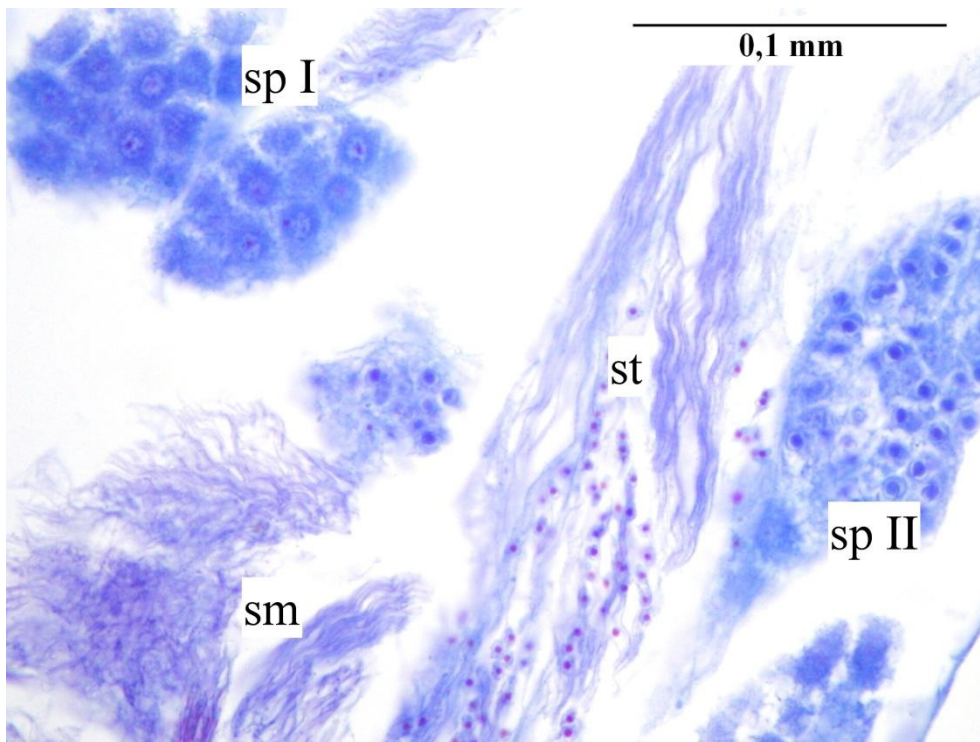
Obr. 4.9 Některé buňky spermatogeneze ve varlatech samce 14 dnů po ekdyzi (germarium a spermie mimo zorné pole snímku).



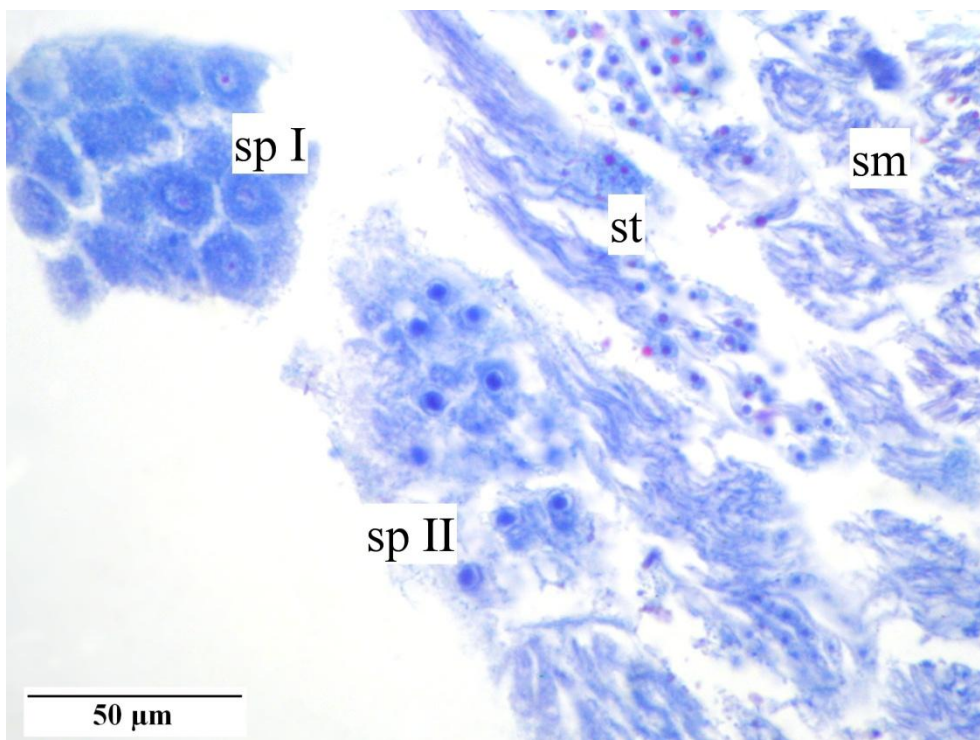
Obr. 4.10 Shluky spermií ve varlatech u samce 14 dnů po ekdyzi.



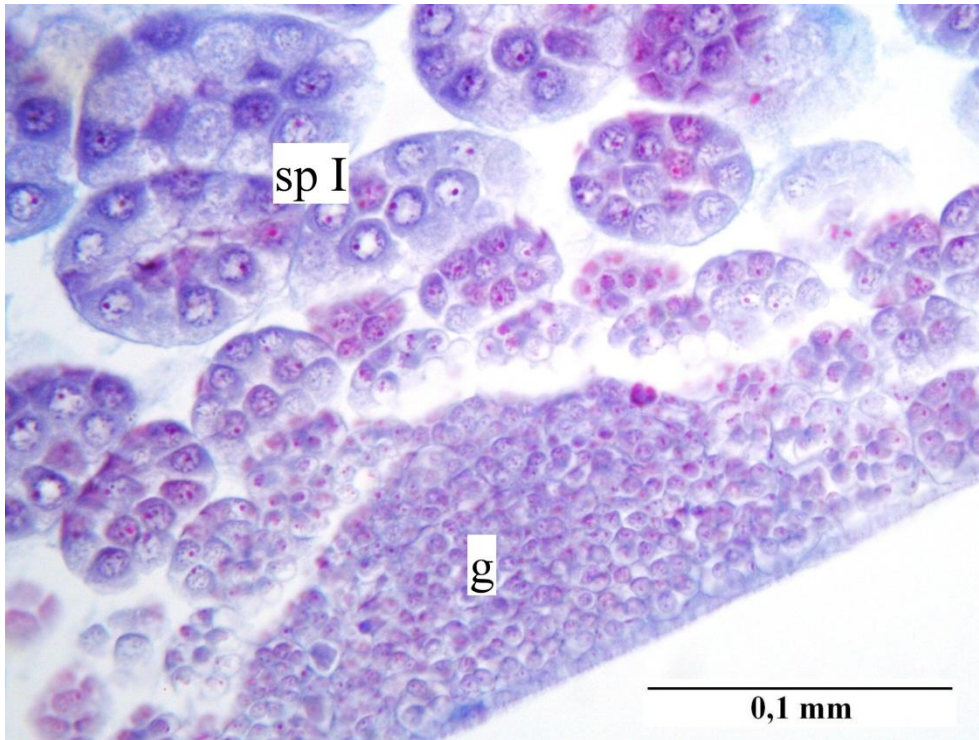
Obr. 4.11 Řez oblastí germaria v testikulárním folikulu samce 25 dnů po ekdyzi. Vlevo jsou patrné postupně se diferencující primární spermatocyty.



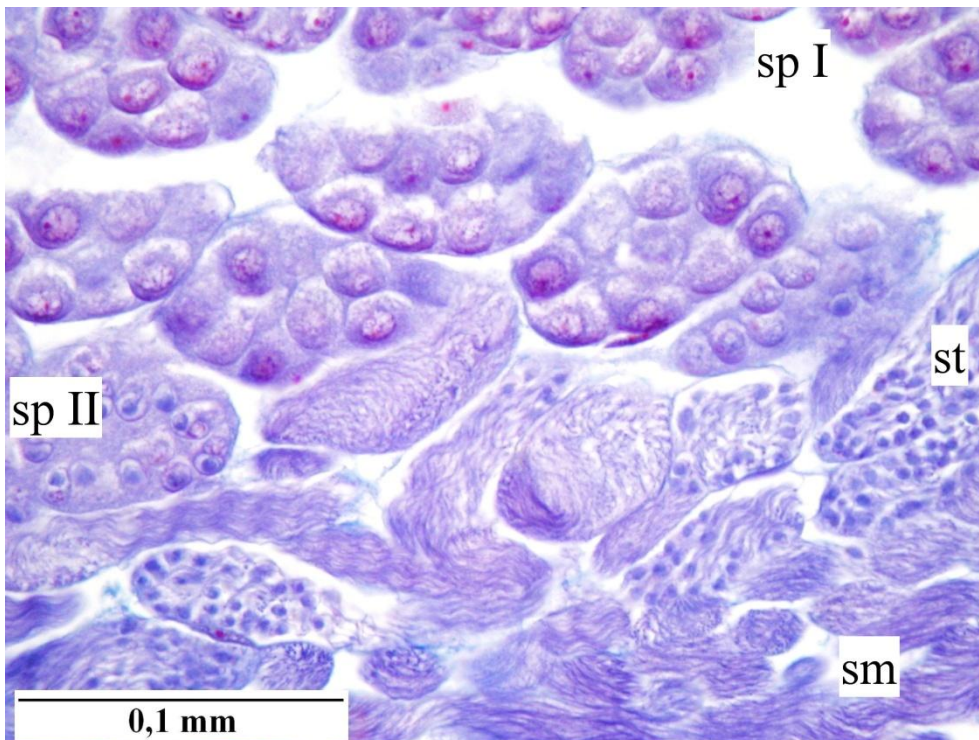
Obr. 4.12 Buňky spermatogeneze ve varleti samce 25 dnů po ekdyzi.



Obr. 4.13 Převažující množství spermatid a spermíí ve varleti samce 42 dnů po ekdyzi.



Obr. 4.14 Řez oblastí germaria testikulárního folikulu varlete samce 60 dnů po ekdyzi.



Obr. 4.15 Spermatoocyty, spermatidy a spermie ve varleti samce 60 dnů po ekdyzi.

4.2.3 Dospělci nedefinovaného stáří odebrání z terénu

4.2.3.1 Samci před přezimováním

Dospělci chytaní a bezprostředně preparovaní 10. 9. 2009

V odebraném vzorku (7 jedinců; ADmP) byli samci s nesklerotizovanou měkkou kutikulou (zřejmě krátce po ekdyzi¹) i samci se sklerotizovanou kutikulou. Samci s nesklerotizovanou kutikulou neměli semenné vajíčky znatelné. Samci s tvrdou kutikulou měli už morfologicky pozorovatelné semenné vajíčky. Ve varlatech všech jedinců byly zjištěny spermatogonie, primární a sekundární spermatocyty a větší množství spermatid a spermií (obr. 4.16).

Dospělci z terénu chytaní 10. 9. 2009 a chování v chovu P do preparace 26. 11. 2009

Samci (3 jedinci; ARmP) měli částečně plné střevo a plné semenné vajíčky. Na řezových mikropreparátech jejich varlat byly zjištěny spermatogonie, spermatocyty, spermatidy a převažovaly spermie (obr. 4.17). Na řezu semennými vajíčky byly dobře patrné spermie, což potvrzuje morfologické zjištění při preparaci (obr. 4.18).

Dospělci z terénu chytaní 24. 11. 09; preparovaní 29. 11. 09

Samci (3 jedinci; AFAm) měli ve všech případech plné střevo, semenné vajíčky plné a dlouhé, delší než u samců z chovu P. Na řezech varlat byly dobře rozpoznatelné spermatogonie (obr. 4.19), primární spermatocyty i spermie. Ostatní typy buněk spermatogeneze nebylo možné pro přebarvení preparátu spolehlivě a s jistotou rozlišit.

4.2.3.2 Samci po přezimování

Dospělci z terénu chytaní 24. 11. 2009; udržování v chladničce při + 4°C bez potravy; preparovaní 12. 1. 2010

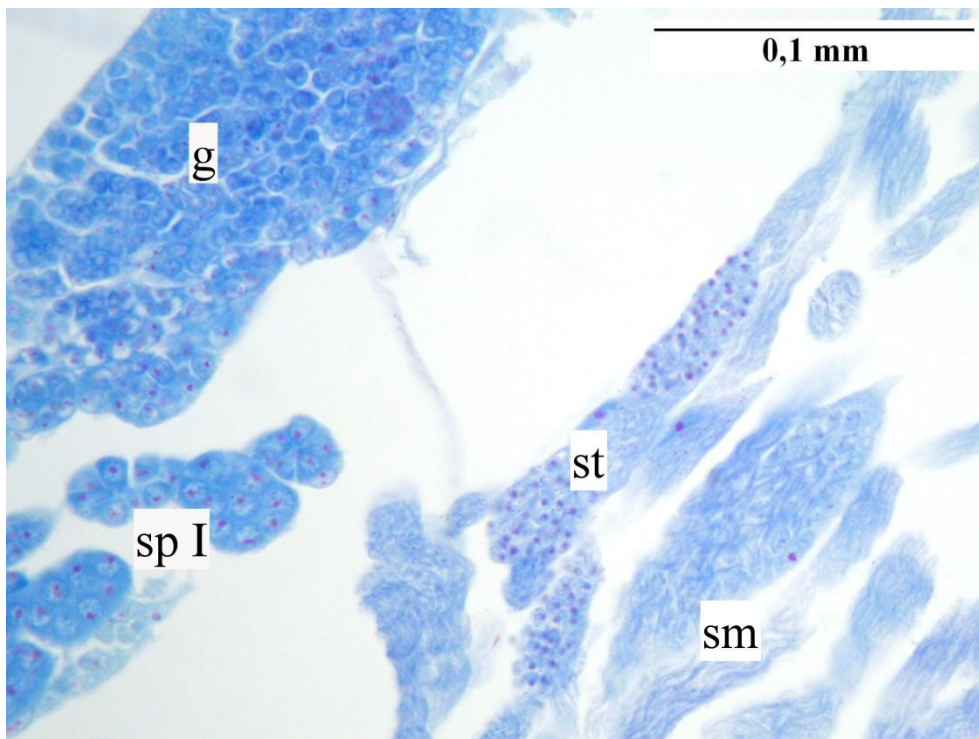
Studována byla spermatogeneze 4 jedinců (3 preparovaní čerstvě po usmrcení, jeden uhynulý; Am). U uhynulého samce nebyly semenné vajíčky zřetelné. Čerstvě usmrcení a preparovaní samci měli prázdné střevo a velké tukové těleso a plné dobře zřetelné semenné vajíčky. Na řezových preparátech (přebarvení preparátů) byly zjištěny

¹ Měkká nesklerotizovaná kutikula ale nemusí pravděpodobně vždy znamenat jen věk blízky poslední ekdyzi (T. Ditrich, ústní sdělení).

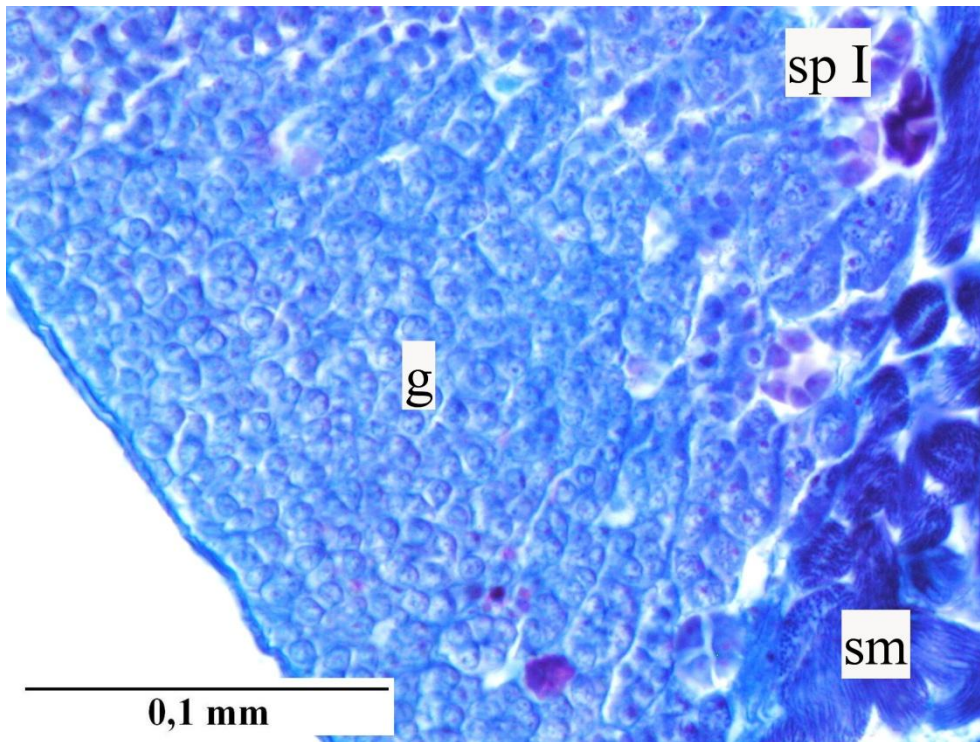
(spermatogonie /odhadnuto dle velikosti a polohy; díky přebarvení nebylo zřetelné jádro/) primárních spermatocyty, (sekundární spermatocyty, spermatidy – viz stejná situace jako v případě spermatogonií). Spermie (sice přebarvené), byly rovněž přítomny. Na řezu semenným váčkem je dobře pozorovatelná vnější vazivová membrána a sekreční epitel se sekretem (obr. 4.20). V semenných váčcích byly zřetelně patrné shluky spermíí (obr. 4.21)

Dospělci chytaní v terénu a bezprostředně preparovaní 6. 4. 2009

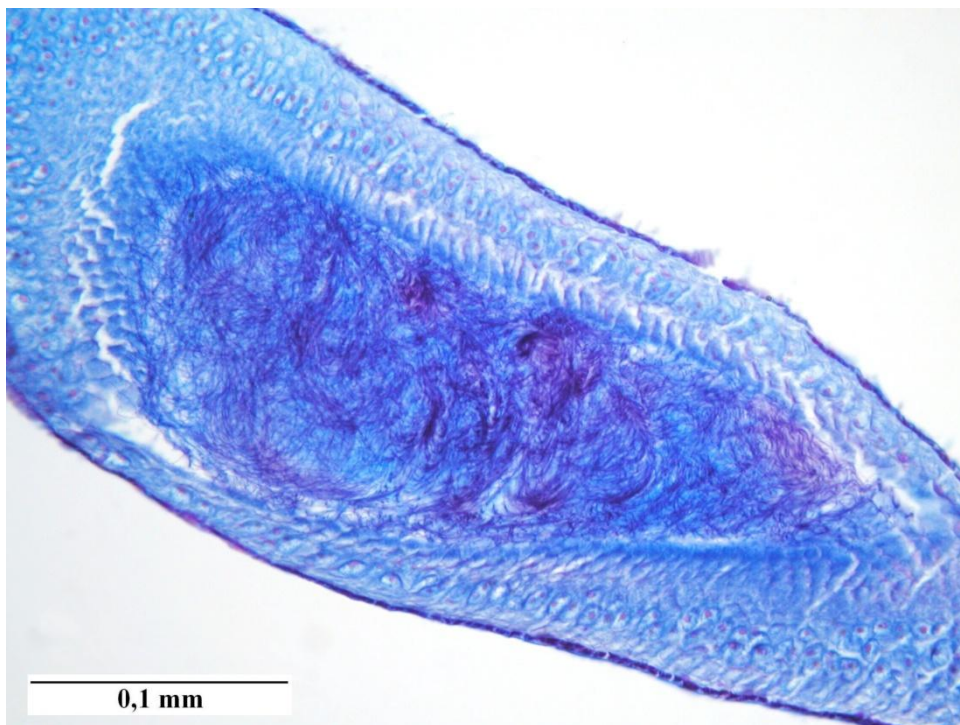
U všech (4 samci; ADmOv) byly pozorovány na chámovodech zřetelně formované semenné váčky. Velikost varlat i semenných váčků byla individuálně rozdílná. Preparáty z tohoto vzorku byly přebarveny (obr. 4.22). Proto bylo možné s jistotou určit na řezech pouze přítomnost primárních spermatocytů a spermíí. V semenných váčcích byly nahromaděny spermie (obr. 4.23).



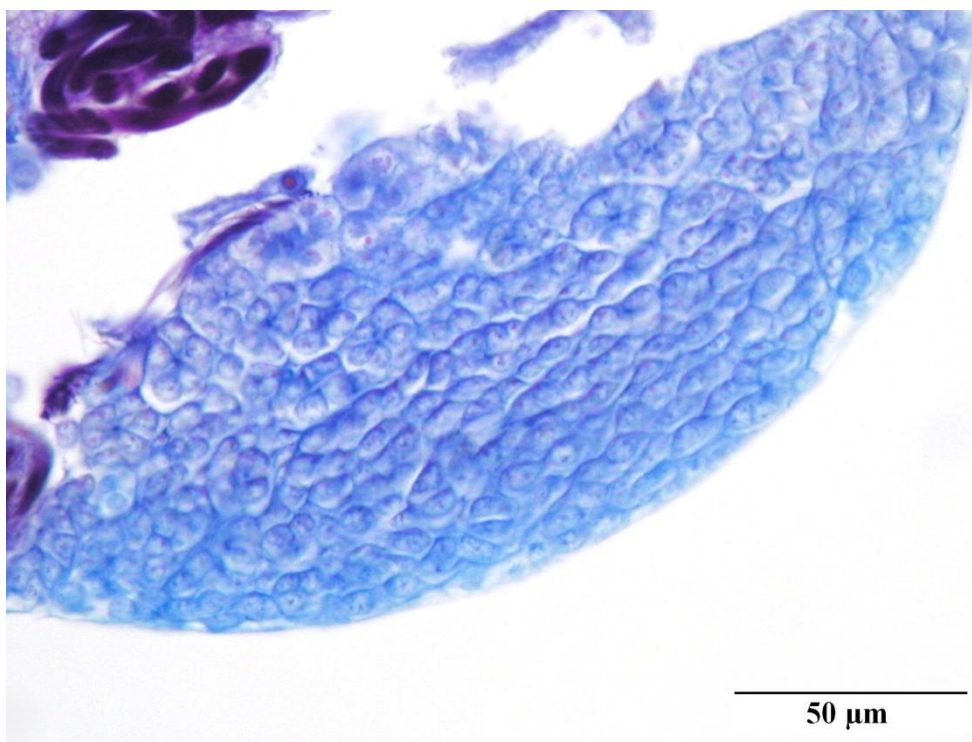
Obr. 4.16 Řez varletem samce nedefinovaného stáří před přezimováním (preparace 10. 9. 2009) (sekundární spermatocyty mimo zorné pole snímku).



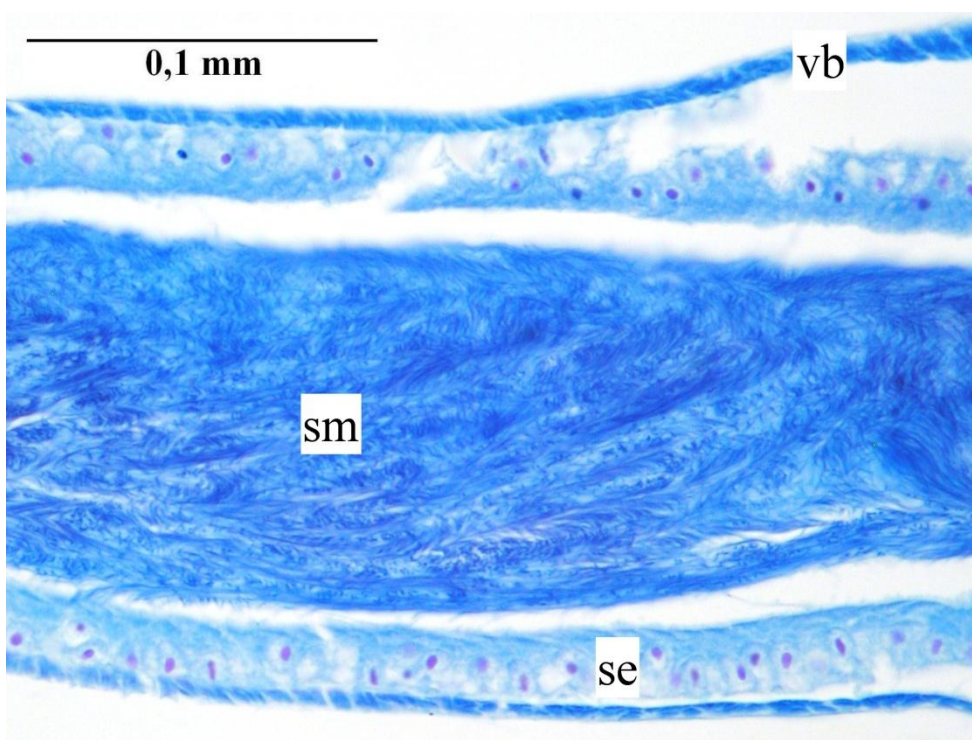
Obr. 4.17 Řez oblastí germaria samce nedefinovaného stáří před přezimováním (preparace 26. 11. 2009) (sekundární spermatocyty a spermatidy mimo zorné pole snímku).



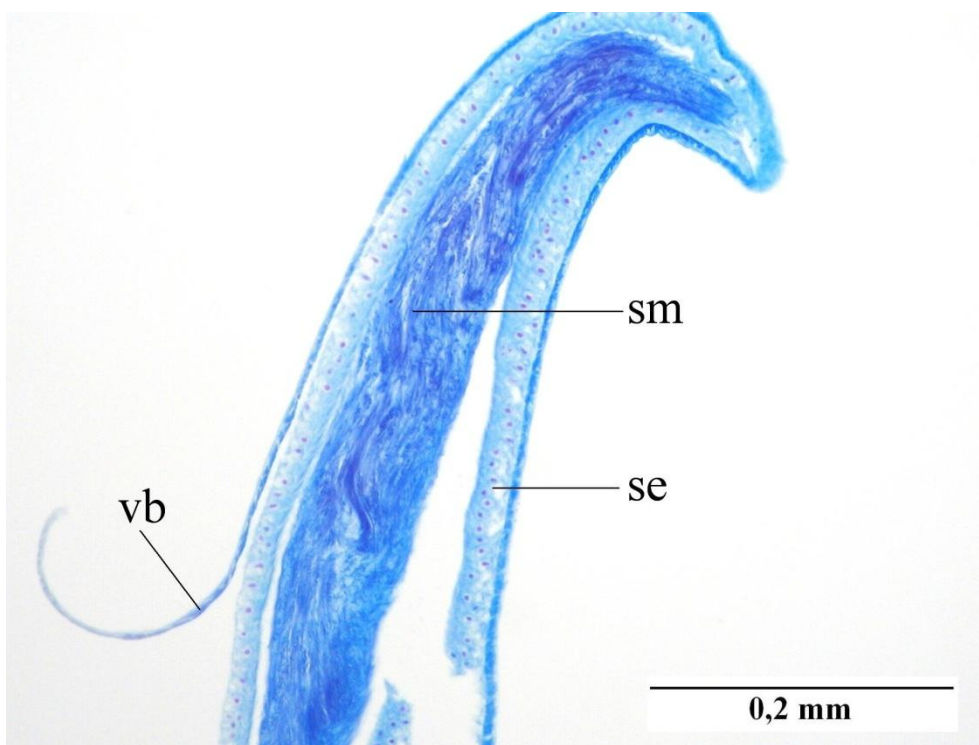
Obr. 4.18 Řez semenným váčkem se spermii samce nedefinovaného stáří před přezimováním (preparace 26. 11. 2009).



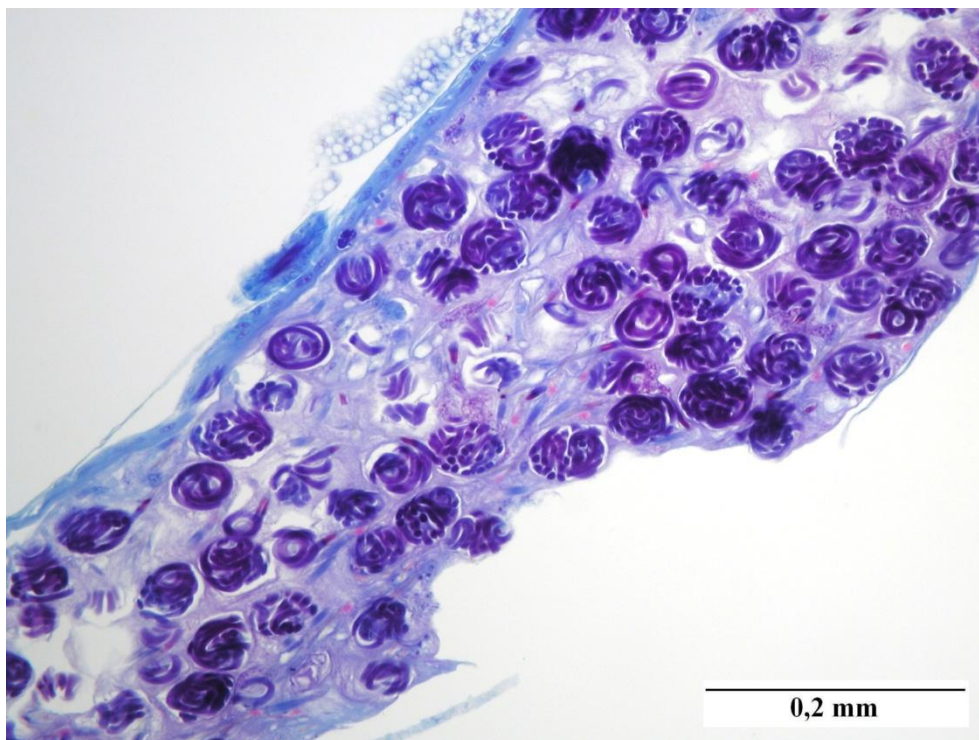
Obr. 4.19 Řez oblastí germaria se spermatogoniemi samce nedefinovaného stáří před přezimováním (preparace 29. 11. 2009).



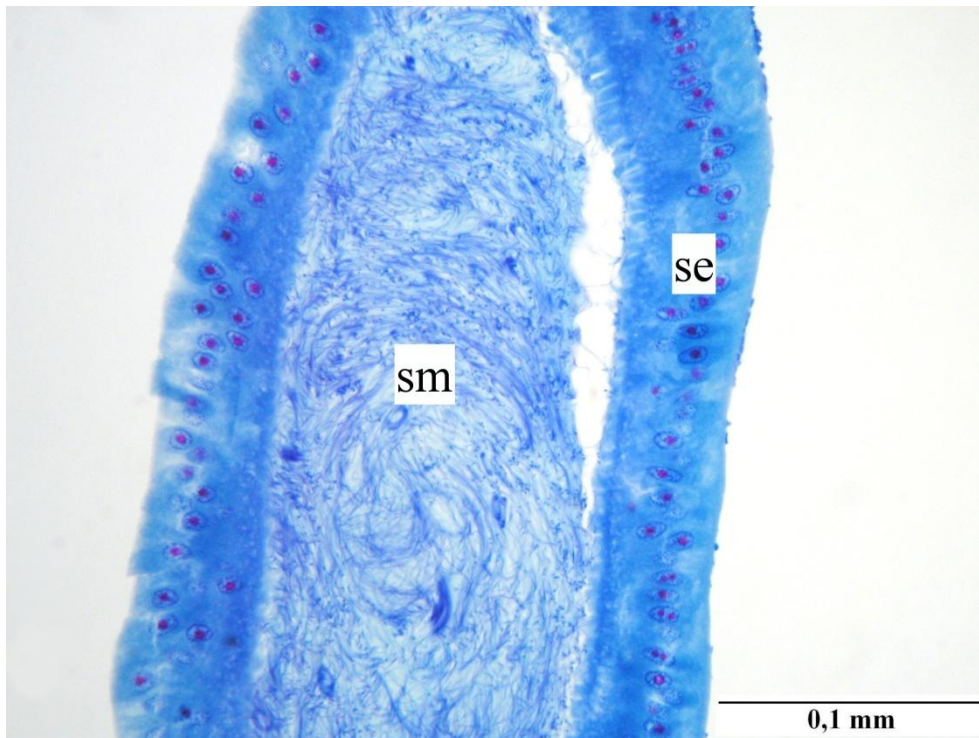
Obr. 4.20 Řez semenným váčkem s patrným sekrečním epitelem samce nedefinovaného stáří po přezimování (preparace 12. 1. 2010) (zkratky viz kap. 3.8).



Obr. 4.21 Řez semenným váčkem se spermii samce nedefinovaného stáří po přezimování (preparace 12. 1. 2010).



Obr. 4.22 Řez varletem samce s přebarvenými klubky spermii u samce nedefinovaného stáří po přezimování (preparace 6. 4. 2009).



Obr. 4.23 Řez semenným váčkem se spermiemi samce nedefinovaného stáří po přezimování (preparace 6. 4. 2009).

4.3 Souhrn histologických a morfologických zjištění

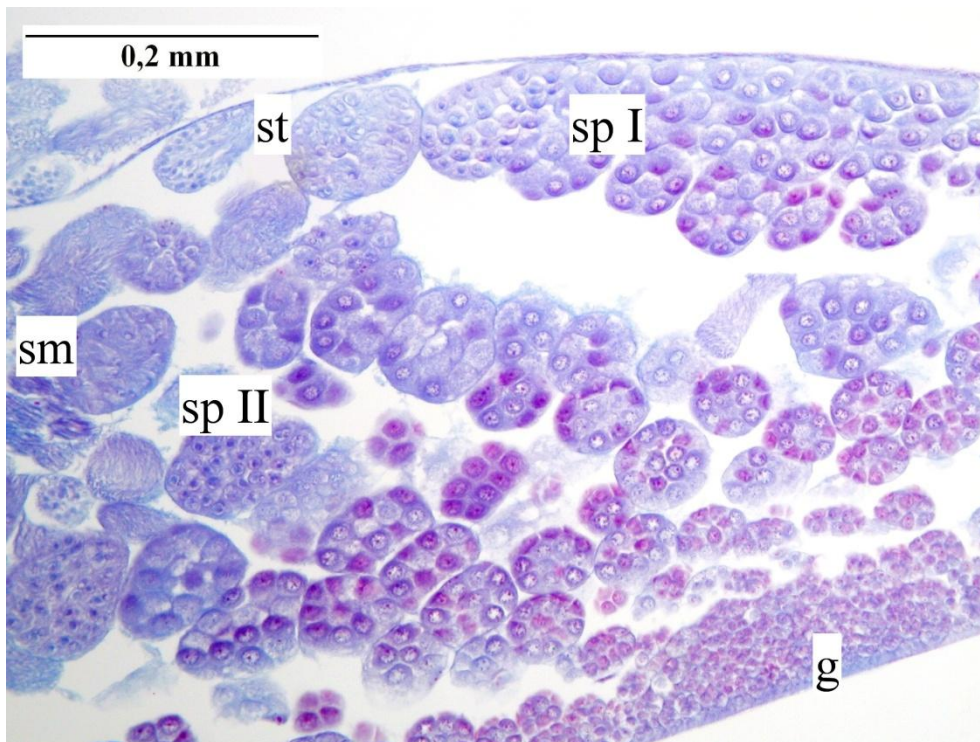
U nymf 5. instaru byly zjištěny všechny fáze spermatogeneze vyjma fáze dokončení spermateliózy. Na řezových mikropreparátech varlat byly nalezeny spermatogonie, oba typy spermatocytů i spermatidy. U dospělců těsně po ekdyzi (1 den po ekdyzi) byly zjištěny kromě spermatogonií, spermatocytů a spermatid i spermie. Stejný stav spermatogeneze byl zjištěn i u všech ostatních věkových skupin jedinců definovaného stáří ze všech tří chovů i u dospělých samců o neznámém stáří z terénu včetně těch, kteří přezimovali.

Epitel semenných váčků se zvětšuje, přechází do sekreční fáze a váčky se stávají i makroskopicky zřetelné už u samců starých 1 den po ekdyzi.

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že spermatogeneze *Velia caprai* neprobíhá v jedné vlně, ale kontinuálně. I u starších dospělců a dospělců po přezimování lze nalézt všechny typy buněk spermatogeneze. (U přezimujících samců byl shluk buněk odpovídajících spermatogoniím v oblasti germaria též zjištěn, ale kvůli

přebarvení řezů nebyly rozlišitelné všechny jejich diagnostické znaky. Přítomnost primárních spermatocytů byla ale spolehlivě indikována na všech řezech varlat všech preparovaných samců.)

Jistý náznak prostorové posloupnosti průběhu spermatogeneze směrem od germaria k ústí chámovodu (germarium obsahující spermatogonie → primární spermatocyty → sekundární spermatocyty (prespermatidy) → spermatidy → spermie → ústí chámovodu) je na řezových mikropreparátech patrný (viz obr. 4.1). Stabilní polohu mají však jen germarium a spermatogonie. Další typy buněk spermatogeneze byly zaznamenány na různých místech řezů varletem (prostoru varlete). Častým zjištěním byl nález vzájemného „promíchání“ cyst s různými stádii buněk spermatogeneze. To znamená, že primární spermatocyty byly nalézány např. blíže ústí chámovodu než sekundární spermatocyty a spermatidy (obr. 4.24). Spermocysty či svazky spermií po dezintegraci stěny spermocysty se nacházejí v celé šířce varlete, tzn. ne pouze v oblasti, kde vstupují z varlete do chámovodu.



Obr. 4.24 Řez varletem se všemi typy buněk spermatogeneze u samce 60 dnů po ekdyzi.

5 DISKUZE A ZÁVĚRY

Za normálních okolností jsme zvyklí hodnotit spermatogenezi na řezech po délce trubicovitých testikulárních folikulů tzn. od germaria dolů, směrem k vyústění testikulu do chámovodu. U *Velia caprai* je ale varle v rámci situace u ploštic obecně atypické. Jak uvádí Obenberger (1952), varle ploštic tvoří nejméně 2, nejvíce 8, ale zpravidla 7 testikulárních folikulů. Situace u hladinatky *Velia caprai* se ale tomuto schématu vymyká. Pendergrast (1957) zmiňuje, že varle samců studovaného druhu je tvořeno pouze jediným folikulem, což bylo na řezových preparátech potvrzeno a velmi dobře patrné. Avšak varle, a tím i testikulární folikul, je širší než jeho teoretický anatomický podélný rozměr. Pokud bychom tedy posuzovali histologické řezy varletem *V. caprai* dle situace známé u ostatních ploštic, došli bychom k názoru, že se germarium nachází laterálně. Ovšem tomu tak není. Germarium lze dobře nalézt dle přítomnosti spermatogonií, a to na protilehlé straně od vyústěné folikulu do chámovodu. Není zcela vyloučeno, že původní situací u předků druhu mohly být testikulární folikuly dva a postupem času došlo k jejich srůstu i srůstu oblastí germarií. To by hypoteticky mohlo umožnit již zmiňovanou větší šířku varlete. Zcela hypoteticky a nevýrazně by to mohl indikovat i postup buněk spermatogeneze od germaria „po obvodu“ testikulu k chámovodu, patrný nezřetelně na některých řezových mikropreparátech, i když míra „promíchání a neposloupnosti“ různě zralých spermocyst je velká.

Jak uvádí Ditrich (2005), varlata jsou v průběhu ontogeneze původně kulatá (u nymf 1. instaru) a až během vývoje nymf 2. instaru získávají pro ně typický fazolovitý tvar. Tento autor se však zcela pochopitelně mylně domnívá, že v této době rostou do délky, ve skutečnosti se jedná o růst do šířky. Pokud by se jednalo ancestrálně o dva testikuly, které splynuly, mohlo by jít o růst do délky „po obvodu“ nepravidelného elipsoidu (celkový tvar varlete). Jak dále Ditrich (2005) uvádí, varlata jsou nejdříve orientovaná delší stranou latero – mediálně. Germarium by tak bylo umístěno kraniálně (ancestrální poloha) a odstup chámovodu z varlete kaudálně, což je situace u ploštic běžná. U nymf 5. instaru se však varle delší stranou natáčí kranio – kaudálně a chámovod vystupuje mediálně a po krátkém úseku své délky se stáčí kaudálně (Ditrich 2005). V této době ontogeneze je germarium v tělní dutině, vzhledem k mediální rovině těla, orientováno laterálně. Vzhledem k proximálně-distální ose varlete je ale umístěno skutečně apikálně.

U nymf 5. instaru před posledním svlékáním byly pozorovány pouze spermatidy, nikoli ještě zralé spermie. Stejnou situaci zmiňují i Papáček a Soldán (2008) u *Aphelocheirus aestivalis*. Dále uvádějí, že spermie tohoto druhu se začínají objevovat až během dvou týdnů po ekdyzi do dospělých samců. U *Velia caprai* tomu bylo už u samců do 1 dne po svlečení. Další podobností je, že u těchto dlouhověkých druhů lze všechny buňky spermatogeneze nalézt u dospělců různého stáří i po přezimování. Nedochozí tedy k tomu, že by spermatogeneze probíhala v jedné vlně jako u univoltinních ploštic (srovnej např. Papáček a Gelbič 1987, Papáček a Soldán 1992). Rovněž nedochází k situaci kdy by byly folikuly (zde folikulus) varlete prázdné, redukovaly se a spermie se objevovaly pouze v chámovodu či semenných váčcích jako v případě př. bodule obecné (viz Papáček a Gelbič, 1987).

Spermatogeneze dlouhověkého druhu hladinatky *V. caprai* tedy neprobíhá v jedné vlně, ale stejně jako u dlouhověké bentické vodní ploštic *Aphelocheirus aestivalis* probíhá kontinuálně.

Jak bylo zmíněno, zralé spermie byly pozorovány už u dospělých samců *V. caprai* jeden den po svlékání. To ovšem nestačí k odhadnutí doby, kdy jsou samci schopni se rozmnožovat. Pro to by bylo třeba zjistit, kdy spermie sestupují do semenných váčků. Za tímto účelem byla pro studium spermatogeneze preparována vždy celá pohlavní soustava. Bohužel, ne vždy byly na řezových mikropreparátech nalezeny řezy chámovodu a semenných váčků u jedinců přesně definovaného stáří. Nicméně situace pozorovaná makroskopicky i řezy pohlavní soustavy samců neznámého stáří z terénu naznačují schopnost páření již před přezimováním.

Další možností, jak zjistit přibližně dobu možného páření, resp. funkčního rozmnožování, bylo hledání spermií ve spermatéce samic stejného věku. To se bohužel také spolehlivě kvůli kvalitě preparátů nepodařilo. Spermie byly pozorovány pouze ve spermatéce samic před přezimováním odchycených z terénu (preparované 10. 9. 09 a 26. 11. 09) (K. Málková, ústní sdělení). V chovu B bylo sice pozorováno páření, ale až u dospělců 80 dnů po ekdyzi, tj. za hranicí sledovaného stáří.

Nepřímou indicií může být zjištění vedoucího DP, který při preparaci samce 42 dnů starého zjistil, že se jeden semenný váček začíná plnit spermii (preparace v procházejícím světle) (M. Papáček, ústní sdělení). Podle toho lze usuzovat, že dospělci tohoto věku, byť i z chovu, jsou schopni rozmnožování. Tento údaj odpovídá i Ditrichovu (2005) zjištění, který uvádí, že u samců 42 dnů po ekdyzi dochází k růstu

semenných váčků do šířky, což poukazuje na jejich plnění spermiemi a tedy i plnou pohlavní zralost.

Semenné váčky plné spermií (pozorováno morfologicky a histologicky) byly nalezeny u samců z terénu. A to u samce neznámého věku před přezimováním (teoreticky ale mohl už zimovat podruhé – viz dlouhověkost) a u samců preparovaných po přezimování.

Při sledování variability, resp. rychlosti spermatogeneze stejně starých dospělých samců v závislosti na různých podmínkách (v různých chovech B, M, P), bylo zjištěno, že variabilita spermatogeneze jedinců z různých chovů odpovídá variabilitě spermatogeneze různých jedinců jednoho chovu (v rámci každého z vedených chovů).

6 SEZNAM LITERATURY

- ANDERSEN N. M. 1995: Infraorder Gerromorpha Popov, 1971 – semiaquatic bugs. Pp. 77 – 114. In: Aukema B., Rieger Ch., 1995: Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. The Netherlands Entomological Society, Ponsen & Looijen, Wageningen, The Netherlands. 222 pp.
- DALLAI R., AFZELIUS B. 1980: Characteristics of the Sperm Structure in Heteroptera (Hemiptera, Insecta). J. Morphol., 164 (3): 301 – 309.
- DITRICH T. 2005: Životní cyklus a vývoj reprodukčních orgánů hladinatky *Velia caprai* Tamanini, 1947 (Hemiptera: Heteroptera: Veliidae). Magisterská diplomová práce, Jihočeská univerzita, Pedagogická fakulta, České Budějovice. 139 s.
- DITRICH T., PAPÁČEK M. 2008: Obyčejná i neobyčejná hladinatka. Živa, 5: 218 - 219.
- DITRICH T., PAPÁČEK M. 2009: Effective strategy of the overwintering of semiaquatic bugs: overwintering of *Velia caprai* (Heteroptera: Gerromorpha: Veliidae). J. Nat. Hist. 43: 529 – 543.
- GILLOT C. 1995: Entomology. 2nd. ed. Plenum Press, New York. 798 pp.
- HORN D. 1978: Biology of Insects. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pa. 439 pp.
- HŮRKA K., ČEPICKÁ A. 1980: Rozmnožování a vývoj hmyzu. SPN, Praha. 224 s.
- KOVAŘÍK F. a kol. 2000: Hmyz. Madagaskar, Jihlava. 295 s.
- OBENBERGER J. 1952: Entomologie I. Přírodovědecké vydavatelství, Praha. 869 s.
- OBENBERGER J. 1958: Entomologie IV. Československá akademie věd, Praha. 614 s.
- PAPÁČEK M., JANDOVÁ L. 2003: Extrémní variabilita životních cyklů hladinatky *Velia caprai*, Tamaniny 1947 (Heteroptera: Gerromorpha: Veliidae): studie v přírodních podmínkách Novohradských hor. pp. 149-162. In: Papáček M. (ed): Biodiverzita a přírodní podmínky Novohradských hor II, Jihočeská univerzita a Entomologický ústav AV ČR. 200 s.

- PAPÁČEK M., GELBIČ I. 1989: Development of the male internal reproductive system in the saucer bug (*Ilyocoris cimicoides* L.) (Heteroptera, Naucoridae). Pp. 125 – 140. In: Tonner M., Soldán T., Bennettová B. (eds.): Regulation of Insect Reproduction IV. Proceedings of a symposium held in Žižkovy, September 1987. Academia, Praha, 539 pp.
- PAPÁČEK M., SOLDÁN T. 1992: Development of male internal reproductive system in *Notonecta glauca* (Heteroptera, Notonectidae). pp. 199 – 210. In: Bennettová B., Gelbič I. & Soldán T. (Eds.): Advances in regulation of insect reproduction. Czech Acad. Sci. České Budějovice. 412 s.
- PAPÁČEK M., SOLDÁN T. 2008: Struktura and development of reproductive system in *Aphelocheirus aestivalis* (Hemiptera: Heteroptera: Nepomorpha: Aphelocheiridae). Acta Ent. Mus. Nat. Pragae. 48 (2): 299 – 318.
- PENDERGRAST J. G. 1957: Studies on the reproductive organs on the Heteroptera with a consideration of their bearing classification. Trans R. Ent. Soc. Lond., 109 (1): 1-63.