

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

Cambarellinae: Trpaslíci ve světě račích spermií?

Autor: Bc. Jan Toman

Vedoucí diplomové práce: Ing. Antonín Kouba, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: MSc. Kifayatullah

Studijní program a obor: N4106 Zemědělská
specializace, Rybářství a ochrana vod

Forma studia: Prezenční

Ročník: Druhý

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá 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 odevzdávanému textu do 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 na Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2021

Bc. Jan Toman

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu mé diplomové práce Ing. Antonínu Koubovi, Ph.D. a konzultantovi MSc. Kifayatullahovi za poskytnutí odborné pomoci, při tvorbě mé diplomové práce a za jejich ochotu a aktivní přístup. Dále bych rád poděkoval Laboratoři elektronové mikroskopie, Parazitologického ústavu, Biologického centra AV ČR a všem lidem, kteří mi jakoukoliv cestou pomohli k vytvoření této práce.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Jan TOMAN
Osobní číslo: V19N009P
Studijní program: N4106 Zemědělská specializace
Studijní obor: Rybářství a ochrana vod
Téma práce: Cambarellinae: trpasličí ve světě račích spermií?
Zadávací katedra: Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Zásady pro vypracování

U račích vajíček prozatím nebyla nikdy pozorována přítomnost mikropyle, pravděpodobně se u nich tak nevyskytuje specifické místo, na které by spermie se svým akrozomem v rámci procesu oplození nasedala a místo průniku DNA samce do vajíčka tak může být dost možná náhodné. Rozměry mikropyle a akrozomu spermií tak nemusí být striktně velikostně komplementární. Přesto se ale zdá, že mezi velikostí vajíček a akrozomu spermií existuje určitá korelace pozorovatelná na úrovni račích čeledí, popř. ekologických strategiích jednotlivých druhů. Druhy s většími vajíčky mají tendenci mít spermie s akrozomy větších rozměrů. Pro podpoření této hypotézy se jako ideální jeví studium spermií raka mexického, jenž patří do podčeledi trpasličích raků. Ten má ze své podstaty vajíčka velmi malá, což by se mohlo odrazit i na velikosti akrozomu jeho spermií.

Cílem této diplomové práce bude popsat ultrastrukturu spermií raka mexického včetně biometrické charakterizace akrozomu diskutované v kontextu dříve studovaných račích druhů.

Rozsah pracovní zprávy: 50-70 stran
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Kouba, A., Niksirat, H., & Bláha, M. (2015). Comparative ultrastructure of spermatozoa of the redclaw *Cherax quadricarinatus* and the yabby *Cherax destructor* (Decapoda, Parastacidae). *Micron* 69, 56-61.
- Niksirat, H., Kouba, A., Pšenička, M., Kuklina, I., & Kozák, P. (2013). Ultrastructure of spermatozoa from three genera of crayfish *Orconectes*, *Procambarus* and *Astacus* (Decapoda: Astacoidea): New findings and comparisons. *Zoologischer Anzeiger* 252, 226-233.
- Niksirat, H., Kouba, A., Rodina, M., & Kozák, P. (2013). Comparative ultrastructure of the spermatozoa of three crayfish species: *Austropotamobius torrentium*, *Pacifastacus leniusculus*, and *Astacus astacus* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Morphology* 274, 750-758.
- Yazicioglu, B., Hamr, P., Kozák, P., Kouba, A., & Niksirat, H. (2016). Fine structure of the spermatozoon in three species of Cambaridae (Arthropoda: Crustacea: Decapoda) *Cambarus robustus*, *Orconectes propinquus* and *Orconectes rusticus*: a comparative biometrical study. *PeerJ* 4, e2363.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Antonín Kouba, Ph.D.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Konzultant diplomové práce: MSc. Na Kifayatullah
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání diplomové práce: 3. února 2020

Termín odevzdání diplomové práce: 3. května 2021



prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
děkan

L.S.



prof. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2020

Obsah

1. Úvod	8.
2. Literární rešerše	9.
2.1. Rozmnožování sladkovodních raků	9.
2.1.1. Sexuální reprodukce u raků	9.
2.1.1.1. Páření raků	13.
2.1.1.2. Kladení a oplození vajíček	15.
2.1.1.3. Inkubace	16.
2.1.1.4. Líhnutí a postembryonální vývoj	16.
2.1.1.5. Plodnost u raků	17.
2.1.2. Partenogeneze	19.
2.1.3. Intersexualita	21.
2.1.4. Hermafroditismus	22.
2.2. Pohlavní buňky raků	22.
2.2.1. Vajíčka	22.
2.2.2. Spermie	24.
3. Materiál a metodika práce	32.
3.1. Odběr vzorků experimentálních raků	32.
3.1.1. Příprava pro transmisní elektronovou mikroskopii	32.
3.1.2. Finální zpracování vzorků pro TEM	36.
3.2. Postup měření biometrie spermií	39.
4. Výsledky	41.
4.1. Ultrastruktura spermií trpasličích raků	41.
4.2. Biometrie spermií trpasličích raků	44.

5. Diskuse	44.
6. Závěr	50.
7. Přehled použité literatury	51.
7.1. Internetové odkazy	59.
8. Abstrakt	60.
9. Abstract	61.

1. Úvod

Studium reprodukce raků je velmi významnou a rozvíjejících se oblastí současné astakologie. Raci jsou vysoce diversifikovanou skupinou zahrnující největší sladkovodní bezobratlé živočichy, jenž hrají významnou ekologickou roli ve sladkovodních ekosystémech. Přetrvávajícím nedostatkem hlubších znalostí reprodukční biologie je ultrastruktura jejich spermií. Spermie sladkovodních desetinožců jsou se svou morfologií velmi různorodé, což z nich činí vhodné kandidáty pro fylogenetické studie. Ultrastruktura spermií sladkovodních raků již byly předmětem několika studií, které se zabývali morfologickými a biometrickými znaky několika druhů raků. Jejich zaměření je však soustředěno pouze na několik, v řadě případů se mezi studii opakujících druhů, které ani zdaleka nepostihují širokou diverzitu této skupiny. Cílem předložené práce bylo popsat ultrastrukturu a biometrii spermií dvou zástupců takzvaných „trpasličích“ druhů raků (podčeledi *Cambarellinae*), jenž v tomto ohledu nebyly doposud studovány, a následně je porovnat s již známými informacemi.

Na základě prozatím známých skutečností se zdá, že mezi velikostí vajíček a akrozomu spermií existuje určitá korelace. Zástupci čeledi *Astacidea* mají obecně vajíčka i akrozom značně veliké. Velikostně významná odlišnost zde studovaných trpasličích raků, konkrétně raka mexického *Cambarellus patzcuarensis* Villalobos, 1943 a raka brazoského *Cambarellus texanus* Albaugh and Black, 1973 je pro studium tohoto možného vztahu ideální. Pokud by tato hypotéza platila, pak by rak mexický a rak brazoský mající výrazně menší vajíčka měli mít i podstatně menší spermie, potažmo akrozom, než ostatní račí druhy.

Cílem této diplomové práce bylo shrnout doposud známé informace o ultrastruktuře a biometrii spermií sladkovodních raků a tyto rozšířit o data získaná vlastní studií dvou druhů trpasličích raků (podčeleď *Cambarellinae*) a ty následně porovnat.

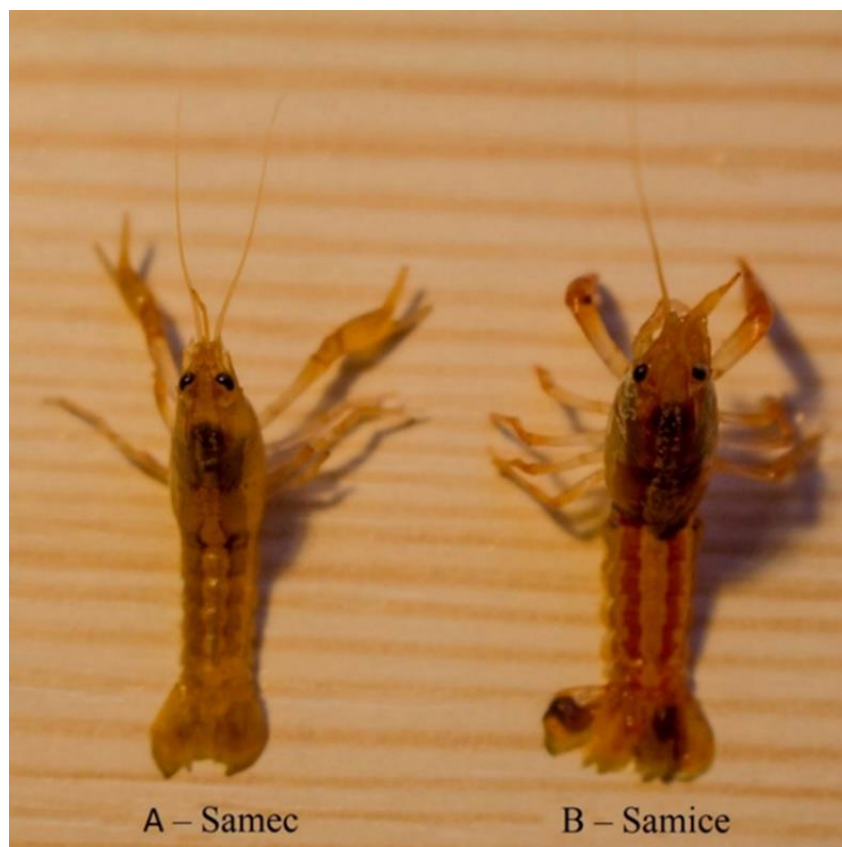
2. Literární rešerše

2.1. Rozmnožování sladkovodních raků

Drtivá většina desetinoých sladkovodních korýšů má oddělené pohlaví a rozmnožuje se sexuálně (Charniaux-Cotton, 1975). Je ale možné se setkat i s několika odchylkami, jako je například intersexualita, partenogeneze nebo hermafroditismus, které mohou platit pro celý druh, pro některé populace daného druhu (Rudolph, 2002), nebo jen pro konkrétní jedince (Sagi a kol., 2002). Jednotlivé příklady těchto odchylek jsou uvedeny níže.

2.1.1. Sexuální reprodukce

Běžnou strategií reprodukce raků je sexuální gonochorismus, kdy rozeznáváme u každého jedince pouze jedno pohlaví: samec nebo samice (Kozák a kol., 2015). Základním rozpoznáním račího pohlaví je tzv. pohlavní dimorfismus (Obr 1.). Jedná se o primární a sekundární odlišnosti těla samce a samice stejného druhu. Primární odlišností je samotná přítomnost samčích nebo samičích orgánů. U samců varlata a u samic vaječníky. Základními sekundárními odlišnostmi, podle kterých můžeme odlišit samce od samice, je lokace vyústění pohlavních žláz viz. níže. U samců některých čeledí se dále jedná o pářící nožky (gonopody) a u samic pak o přítomnost semenné schránky *annulus ventralis*. Zároveň můžeme brát v potaz na izometrický (juvenilní) a alometrický (adultní) růst jedinců. Při izometrickém růstu raka rostou všechny části těla do pohlavní dospělosti samice i samce stejně rychle a jsou proporcionálně stejně veliké. Naopak alometrický růst v dospělosti raka je charakterizován tak, že jedna část těla roste rychleji než ostatní. U samic roste daleko rychleji zadeček a hlavohruď, které jsou podstatně širší než u samců. Naopak samecům rostou rychleji klepeta, která jsou o poznání větší než u samic. U samice je zadeček širší kvůli snůšce vajíček, která je v době inkubace přichycena na pleopodech samice. V podstatě platí, že čím větší a širší zadeček, tím větší prostor pro umístění a ochranu snůšky. U samců je velikost klepet dána zvýšenou aktivitou v interakcích s ostatními račími jedinci, či případnými predátory (Kozák, a kol., 2015; Buřič a kol., 2020).



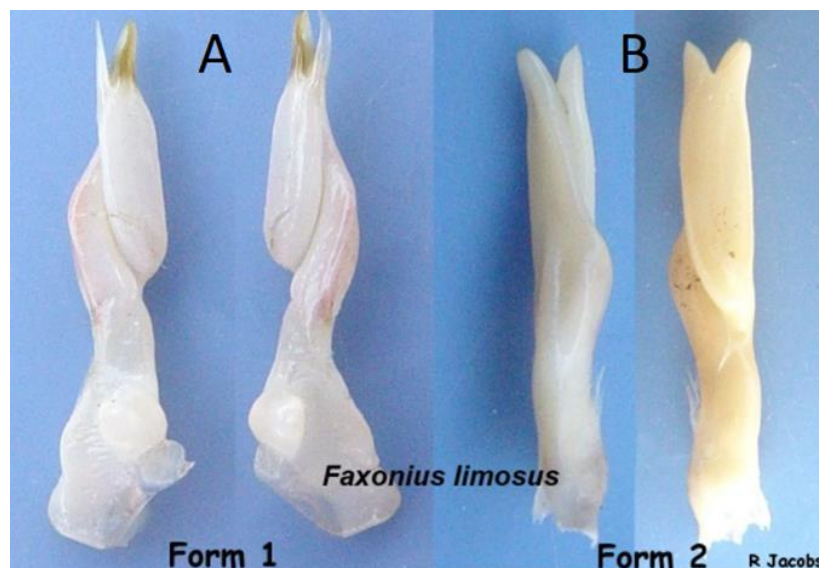
Obr. 1. Pohlavní dimorfismus znázorněný na raku mexickém *Cambarellus patzcuarensis*: **A** – Samec, **B** – Samice, foto: Autor).

Samčím pohlavním orgánem jsou párová varlata (*testes*), které mají vývody (*gonopory*) na základě pátého páru kráčivých končetin (pereopodů; Skurdal a kol., 2002; Obr. 2). Samci čeledi osidlující severní polokouli prodělávají takzvané cyklicky morfologické změny (Scudamore, 1948; Hobbs, 1989; Buřič a kol., 2021), ale je pravděpodobné, že se jedná o obecněji platný princip do jisté míry pozorovatelný u všech račích zástupců. Tyto změny jsou charakterizovány cyklickým dimorfismem u samců, který je spojen s reprodukčním cyklem. Tento cyklus je sezónní a vykazuje dvě střídající se formy zjevné především na morfologii gonopodů. Forma I. (sexuálně aktivní, kdy je rak schopen reprodukce) má oproti formě II. (sexuálně neaktivní, kdy rak není schopen aktivního páření) rovněž delší a širší klepeta (Hobbs, 2001; Obr. 3.). Změna z jedné formy na druhou u samců nastává během svlékání (Guiasu, 2002). Existují však i výjimky, kdy sexuálně aktivní forma může přetrvávat po celý rok (Payne, 1997) pokud dojde pouze k jednomu, nebo žádnému svlékání (Buřič a kol., 2010a, b). K těmto změnám zřejmě dochází v důsledku odlišných požadavků v jednotlivých obdobích roku. V období páření jednotlivých druhů potřebuje samec mít klepeta silná a robustní v případných soubojích

o samice. Naopak v době, kdy je reprodukční agresivita minimální, dochází k co největšímu shromažďování potravy a zde by byla velká klepeta energeticky neekonomická (Stein, 1976; Buřič a kol., 2010a, b). Obecně lze říct, že se tyto raci snaží efektivně využívat zdroje aktuálního období. U čeledi Parastacidae nejsou gonopody přítomné. Pohlavním produktem varlat jsou u raků spermie, které se poté ve vývodných cestách obalují trojvrstevným ochranným obalem do tzv. spermatoforů (Obr. 4).

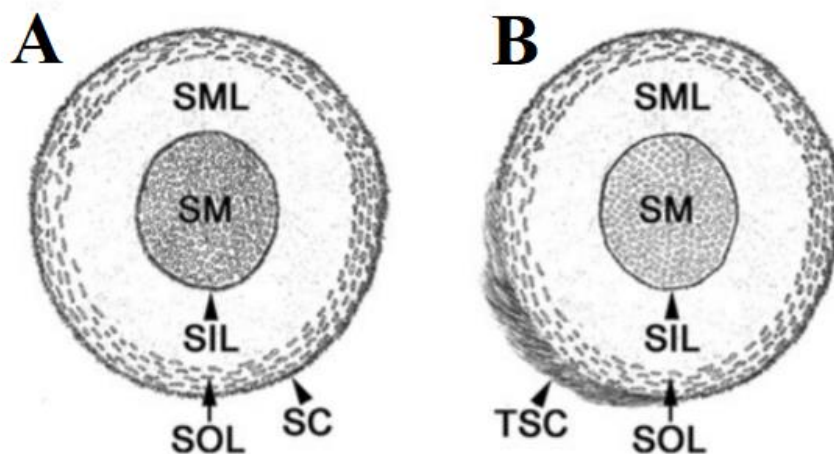


Obr. 2. Pohlavní vývody (*gonopory*) na 5. páru kráčivých končetin a dva páry tzv. pářících nožek (*gonopodů*) samce raka mexického *Cambarellus patzcuarensis*, foto: Autor.



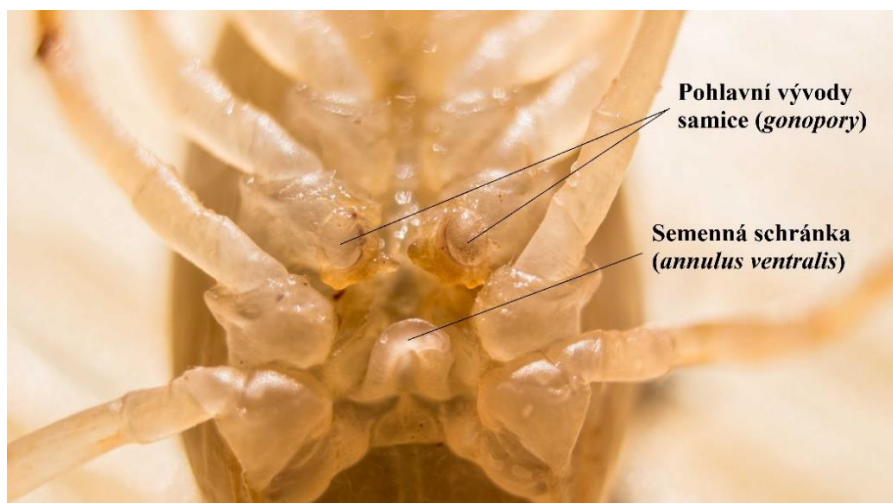
Obr. 3. Cyklické změny gonopodů znázorněné na raku pruhovaném *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817); **A** – Forma I. sexuálně aktivní; **B** – Forma II. sexuálně neaktivní foto: R. Jacobs, převzato z <https://ctdeep.maps.arcgis.com/>.

Spermie vznikají procesem tzv. spermatogeneze (vývoj finálních spermatid ze spermatogonií) a spermiogeneze (vývoj spermatozoí ze spermatid), které probíhají uvnitř varlete. Po dokončení těchto procesů se spermie přesouvají do dvou spletých *vasa deferentia* (část chámovodu; viz. podkapitola 2.2.2.). Spermie jsou v chámovodu baleny do spermatoforů, které chrání spermie při následném přenosu ze samce na samici, ale i poté (Vogt, 2002). U čeledí Astacidae a Parastacidae jsou spermatofory pomocí gonopodů přilepovány na spodní stranu samice k blízkosti vývodných otvorů. U čeledí Cambaridae a Cambaroididae jsou spermatofory samci přenášeny do tzv. semenné schránky (*annulus ventralis*), která je pro tyto čeledi charakteristická (Andrews, 1906; Hobbs a kol., 1977; Vogt, 2002; Kozák a kol., 2015).



Obr. 4. Trojvrstvý spermatofor znázorněný u raka bahenního *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823); **A** – Před pářením; **B** – Po spáření: **SC**: lepkavá vrstva (*sticky coat*); **SM**: masa spermií (*sperm mass*); **SIL**: vnitřní ochranná vrstva spermatoforu (*spermatophore inner layer*); **SML**: střední ochranná vrstva spermatoforu (*spermatophore middle layer*); **SOL**: vnější ochranná vrstva spermatoforu (*spermatophore outer layer*); **TSC**: zesílená lepkavá vrstva (*thickened sticky coat*; Niksirat a kol., 2014; upraveno autorem).

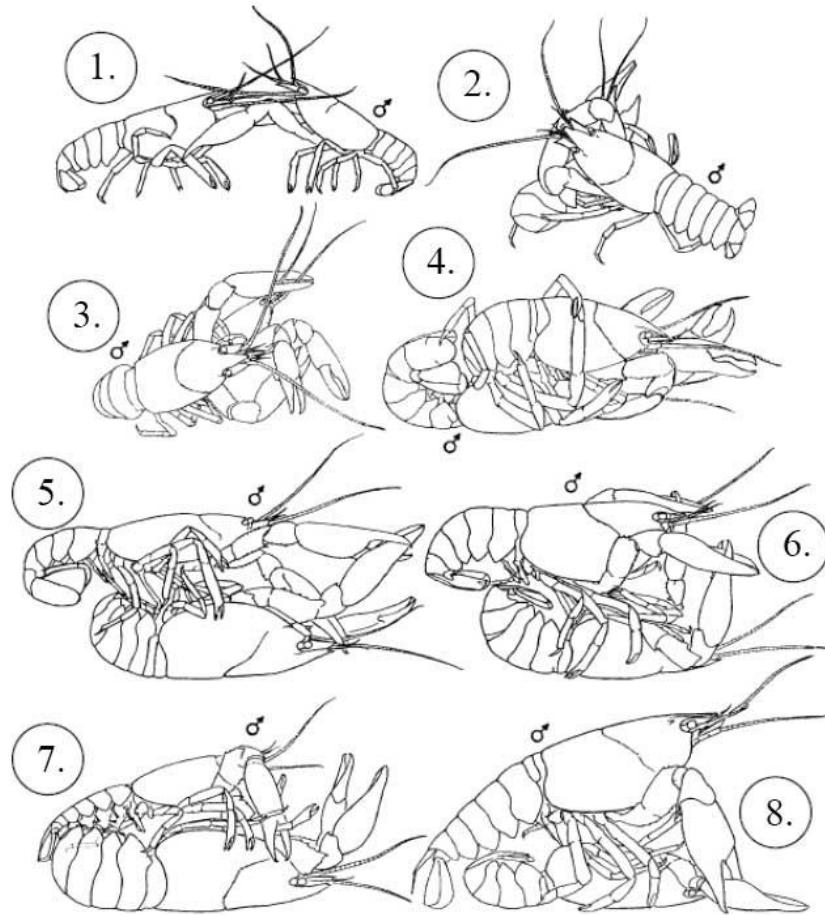
Samičím pohlavním orgánem jsou párové vaječníky (*ovaria*), které mají své vývody (gonopory) na bázi třetího páru pereopodů (Obr. 5.). Pohlavním produktem vaječníků jsou vajíčka, která jsou vejcovody vedena k ústí vývodných otvorů. Spermatofory jsou působením sekretu bílkovinných žláz rozpuštěny (tzv. *glair glands* patrné na spodní straně abdominálních článků a ocasního vějíře zralých samic) a dochází k uvolnění spermií z ochranných obalů spermatoforů. Následuje vnější oplození a následné přichycení vajíček k pleopodům samice (Rodríguez-Serna, 1999; Hamr, 2002).



Obr. 5. Pohlavní otvory (*gonopory*) samice raka mexického *Cambarellus patzcuarensis* na 3. páru kráčivých končetin a tzv. semenná schránka (*annulus ventralis*), foto: Autor.

2.1.1.1. Páření raků

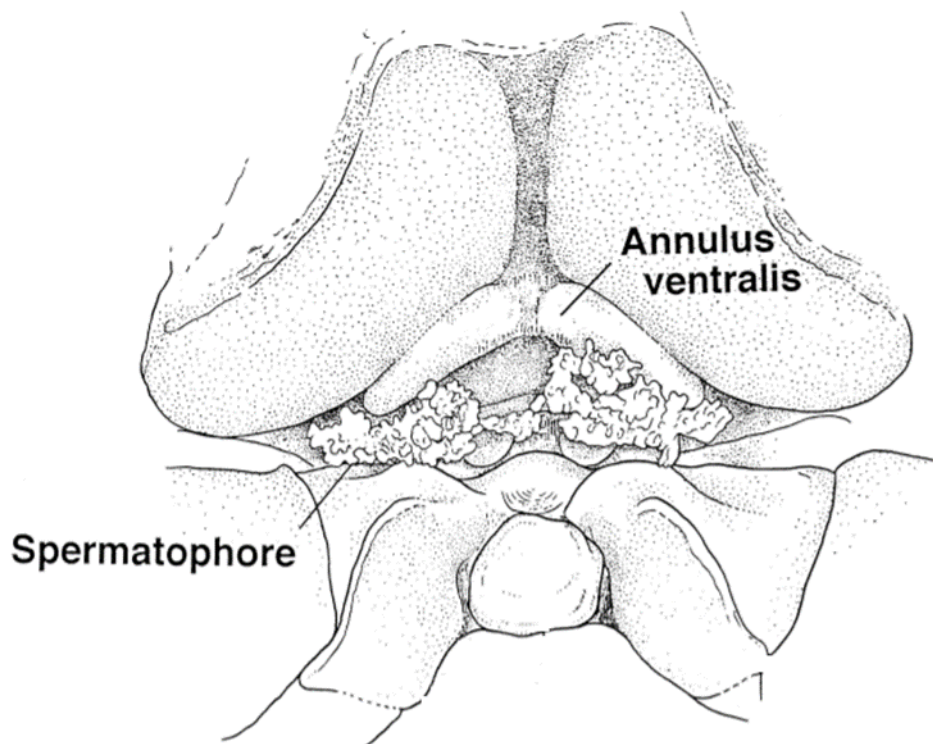
Samotný proces páření raků probíhá v klidných místech toku nebo nádrže, popřípadě uvnitř úkrytů, které si raci postaví nebo naleznou v daném biotopu. U norujících druhů probíhá reprodukce uvnitř nor (Rodríguez-Serna, 1999). Období páření je charakterizováno zvýšenou aktivitou, kdy samec následuje samici a přechází s ní do přímého kontaktu. Tato aktivita je hormonálně řízena a ovlivněna podmínkami, jako jsou především fotoperioda a teplota vody (Dubé a kol., 1992; Reynolds, 2002). Pokud je samice připravena a neuprche před samcem, samec ji obrátí na hřbet a pevně uchopí svými klepety. Stlačuje jí a její klepeta ke dnu. Dochází k přenosu spermatoforů se spermatem, které samec vytlačuje z ústí pohlavních cest na bázi pátého páru pereopodů. Spermatofory jsou následně pomocí samčích gonopodů (vyjma Parastacidae, kteří je absentují) přilepovány na ventrální (spodní) stranu samice, nebo u čeledi Cambaridae jsou spermatofory samci umisťovány do semenné schránky *annulus ventralis* (Skurdal a kol., 2002; Obr. 6. a 7.). U čeledi Cambaroididae jsou spermatofory umisťovány do morfologicky odlišné semenné schránky *annulus ventralis*, která na rozdíl od některých zástupců Cambaridae není dostatečně hluboká a neumožňuje samčí spermatofory zcela uschovat (Obr. 8; Kawai a kol. 2002).



Obr. 6. Průběh páření u sladkovodních raků (Pöckl, 1999).



Obr. 7. Pohlavní rozmnožování znázorněno u raka mexického *Cambarellus patzcuarensis* – samice na zádech, a samec přikládající svou břišní stranu na spodinu břišní samice, foto: Bernd Jung, převzato z <http://www.cambarellus.com>.



Obr. 8. Spermatofory umístěné v *annulus ventralis* raků čeledi Cambaroididae (Kawai a kol. 2002; upraveno autorem).

2.1.1.2. Kladení a oplození vajíček

Kladení vajíček je stejně jako páření stimulováno už zmiňovanými faktory, jako jsou teplota vody a fotoperioda. Interval mezi kopulací a ovulací je u raků druhově specifický a může se pohybovat v rádech dnů i týdnů (Taugbøl a kol., 1990b; Kovačeva, 1998). Před samotným kladením vajíček samice nejprve očistí spodní část svého těla, především své pleopody. K následnému kladení vajíček dochází nejčastěji v nočních hodinách, kdy doba kladení může trvat až 3 hodiny. Spermatofory umístěné samcem jsou rozmístěny kolem vývodných otvorů, ale i na ocasním vějíři samice. U čeledí Cambaridae a Cambaroididae jsou spermatofory umístěné do *annulus ventralis* a k oplození tedy nemusí docházet bezprostředně. Důvodem je, že samice mohou mít spermatofory v *annulus ventralis* uložené i více jak šest měsíců, což je podmíněné intervalem mezi pářením a kladením. Nicméně podle Buřič a kol., (2013) mohou mít takto déle uchované spermatofory i druhy nemající semennou schránku. Při kladení vajíček si samice lehne na záda a stočí svůj ocas, jímž vytvoří uzavřený prostor, do kterého vajíčka uvolňuje (tím vajíčka chrání a eliminuje případné ztráty). V tento moment již započala tzv. sekrece bílkovinných žláz (*glair glands*), které plošně vystupují na spodní straně zadečku. Při ovulaci jsou vajíčka

smíchána se sekretem a díky rozpuštění ochranných obalů spermatoforů dochází k uvolnění spermií, které ovulovaná vajíčka oplozují. Vajíčka jsou následně přichycena na pleopody samice (Vogt, 2002).

2.1.1.3. Inkubace

Po naklazení a upevnění vajíček na pleopody je samice zodpovědná za inkubaci. Při inkubaci samice očišťuje vajíčka, odstraňuje odumřelá vajíčka nebo pomocí pohybů pleopodů vytváří proud vody, který provzdušňuje vajíčka a odstraňuje případné nečistoty (Burton a kol., 2007). Ze začátku inkubace může být značně nebezpečná ztráta vajíček z důvodu nedokonalého přichycení například kvůli nízkému pH nebo rušení samice při a krátce po ovulaci (Taugbøl a kol., 1990a). Doba inkubace je druhově specifická. Pro zástupce čeledi Astacidae je charakteristická dlouhou dobou inkubace od podzimu přes celé zimní období (včetně probíhající diapauzy) až do jara následujícího roku (Skurdal a kol., 2002). K diapauze dochází v zimním období při snížené teplotě, při kterém dochází k zastavení embryonálního vývoje. Tento vývoj znovu započne v jarním období. Tato doba má kladný vliv na synchronizaci embryonálního vývoje zárodků (Taugbøl a kol., 1987). Většina raků amerického původu mají inkubaci oproti evropským druhům značně odlišnou, výjimkou může být např. rak mramorovaný. U raků kladoucích na jaře chybí zmiňovaná diapauza a celková doba inkubace je obvykle od 3 do 6 týdnů. V kontrolovaných podmínkách lze dobu inkubace ovlivnit manipulací teploty vody, a například u evropských raků tak zkrátit inkubační dobu i o několik měsíců (Cukerzis a kol., 1978).

2.1.1.4. Líhnutí a postembryonální vývoj

Období líhnutí ráčat se u raků liší. U evropských druhů raků dochází k líhnutí v jarních měsících. U řady severoamerických raků, kteří jsou schopni se rozmnožovat i 2x ročně, dochází k líhnutí v brzkých letních měsících a na podzim. Při samotném líhnutí dochází k prasknutí vaječného obalu na místě protilehlém pozici stopky, kterou je vajíčko připevněno k samici. Z vajíčka se uvolňuje jedinec v tzv. I. vývojovém stádiu. Toto stádium se vyznačuje stálým přichycením na pleopodech matky u všech druhů sladkovodních raků. Malý jedinec je nejprve přichycen pomocí tzv. *telson thread*, což je vlákno vycházející z telsonu ráčete, kde je přichyceno háčky v jeho terminální části.

Druhý konec vlákna nasedá na vnitřní část vaječného obalu, který je stále připevněn k pleopodům samice (Vogt a kol., 2004b). Vlákno přetrvává po dobu několika hodin, během nichž dochází k aktivnímu přichycení ráčete. U raků severní polokoule se mladý jedinec drží pomocí zpětně zahnutých háčků na obou prstech klepet (Borisov a kol., 2010). Raci jižní polokoule se po vymizení vlákna drží pomocí speciálních háčků na 4. a 5. páru pereopodů (Noro a kol., 2005; Burton a kol., 2007).

Zástupci čeledí Astacidae a Cambaroididae se vyznačují brzkým osamostatněním od samice již ve II. vývojovém stádiu, tj. po prvním svlékání. Zástupci čeledí Parastacidae a Cambaridae jsou charakterističtí prodlouženou mateřskou péčí a osamostatňují až ve III. vývojovém stádiu, tj. až po dvou svlékáních (Reynolds 2002; Scholtz a kol., 2002; Wetzel 2002; Wetzel a kol., 2005).

2.1.1.5. Plodnost u raků

Plodnost je hlavním reprodukčním ukazatelem. Rozdělujeme několik druhů plodnosti. Potencionální plodnost též známá jako ovariální nám značí počet oocytů obsažených ve vaječnících samice. Druhým typem je pleopodální plodnost, která značí počet vajíček připevněných na pleopodech samice. Poslední plodností je tzv. pracovní (skutečná) plodnost, která udává počet už vylíhlých rácat nejlépe ve II., potažmo třetím vývojovém stádiu dle čeledi viz výše. V tabulce jsou uvedené vybrané druhy raků a jejich pleopodální plodnost, délka inkubace a velikost vajíčka (Tab. 1.).

Tab. 1. Plodnost, délka inkubace a velikost vajíčka vybraných druhů raků.

Čeľad'	Druh	Délka inkubace (měsíců)	Pleopodální plodnost (ks)	Velikost vajíčka (mm)
Astacidae	<i>Astacus astacus</i> ¹	7 – 8	90 – 150	2,9
	<i>Astacus pachypus</i> ²	5 – 6	25 – 50	Nezjištěno
	<i>Pontastacus leptodactylus</i> ³	5 – 6	200 – 400	2,7
	<i>Austropotamobius pallipes</i> ⁴	6 – 7	50 – 200	2,7
	<i>Austro. torrentium</i> ⁵	8 – 9	40 – 100	2,6
	<i>Pacifastacus leniusculus</i> ⁶	6 – 8	110 – 200	2,6
Cambaridae	<i>Procambarus clarkii</i> ⁷	1 – 3	200 – 300	1,9
	<i>P. virginalis</i> ⁸	0,5 – 1	50 – 200	1,6
	<i>Faxonius limosus</i> ⁹	1 – 2	100 – 400	1,8
	<i>Faxonius propinquus</i> ¹⁰	Nezjištěno	50 – 250	1,5
	<i>Faxonius rusticus</i> ¹¹	Nezjištěno	75 – 300	2
	<i>Cambarus robustus</i> ¹²	7 – 8	25 – 125	2
	<i>Cambarellus texanus</i> ¹³	0,75 – 1	65 – 108	1
	<i>C. patzcuarensis</i> ¹⁴	0,75 – 1	46 – 98	1
Parastacidae	<i>Cherax cainii</i> ¹⁵	3 – 4	200 – 500	Nezjištěno
	<i>Cherax quadricarinatus</i> ¹⁶	1,5 – 2	200 – 1000	2
	<i>Cherax destructor</i> ¹⁷	0,5 – 1	300 – 500	1,8
	<i>Astacopsis gouldi</i> ¹⁸	6 – 7	250 – 1100	5
Cambaroididae	<i>Cambaroides japonicus</i> ¹⁹	2 – 3	27 – 75	2,3

Tab. 1. Reference: **1** – Skurdal a kol., 1994; Savolainen a kol., 1996; Vozgirdaitė, 1998; **2** – Cherkashina, 1999; Holdich a kol., 2006; **3** – Alekhnovich a Kol., 1996; Stucki, 1999; Skurdal a kol., 2002); **4** – Brewis a kol., 1985; Woodlock a kol., 1988; Carral a kol., 1994; Reynolds, 1998; Grandejean a kol., 2000; **5** – Huber a kol., 2005; Maguire a kol., 2005); **6** – Mason, 1978; Savolainen a kol., 1996; Kirjacainen a kol., 1999; Lewis, 2002; Kouba, 2007; **7** – Oluoch, 1990; Holdich a kol., 2006; McClain a kol., 2007; Alcorlo a kol., 2008; **8** – Seitz a kol., 2005; Holdich a kol., 2006; Vogt, 2010; **9** – Stucki, 2002; Holdich a kol., 2006; Kozák a kol., 2006); **10** – Corey 1987; **11** – Corey 1987; Loughman a kol., 2011; **12** – Hamr a kol., 1985; **13** – vlastní pozorování; **14** – vlastní pozorování; **15** – Beatty a kol., 2003; **16** – King, 1993; Jones, 1995; Rodríguez-González a kol., 2006; **17** – Semple a kol., 1995; Austin, 1998; Lawrence a kol., 2002; Kozák a kol., 2006; **18** – Hamr, 1990; **19** – Kawai a kol., 1994; Nakata a kol., 2004.

2.1.2. Partenogeneze

V reprodukčním světě raků existují výjimky, které se liší od sexuálního rozmnožování, kdy se druhy dokážou rozmnožovat i alternativními způsoby. Takovým příkladem je například partenogeneze a její vybrané formy – apomiktické a fakultativní.

Prvním druhem, u kterého byla tato forma rozmnožování objevena a potvrzena je rak mramorovaný *Procambarus virginalis* Lyko, 2017 (Scholtz a kol., 2003; Obr. 9.), který se rozmnožuje pomocí tzv. apomiktické partenogeneze. To je způsob, kdy oocyty nepodléhají meióze. Všichni potomci jsou pak geneticky totožní (pravé klony) s jejich matkou, což z raka mramorovaného činí zajímavý druh pro laboratorní účely a výzkumy (Vogt, 2008). Dalším druhem, u kterých bylo prokázáno nepohlavní (partenogenetické) rozmnožování je rak pruhovaný *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817) (Obr. 10.), který využívá tzv. fakultativní partenogeneze. Rak pruhovaný se za normálních podmínek rozmnožuje stejně jako ostatní raci sexuálně, ovšem za určitých podmínek, například v momentě, kdy je v populaci nedostatek samců jsou samice odkázány na fakultativní partenogenezi. Fakultativní partenogeneze tedy znamená produkce potomstva bez oplodnění samcem a je pouze příležitostná. V průběhu oogeneze probíhá meióza klasickým způsobem. Dělením primárního oocyty vzniká sekundární polární tělísko, které splyne se samotným oocytem. Díky tomu, že meióza probíhá klasickým způsobem, tak dochází k rekombinaci, a je možný vznik v některých lokusech heterozygotních jedinců (Lampert, 2008). Homozygotní potomci této populace pak nesou pouze mateřské alely, a jsou geneticky velmi podobný svým matkám (Mogie 1986, Watts a kol., 2006). Nicméně raci pruhovaný i nadále preferují spíše sexuální rozmnožování, které vede k přibližně dvojnásobnému počtu potomků, než při fakultativní partenogenezi (Buřič a kol., 2013). U raků čeledí Astacidae, Parastacidae a Cambaroididae nejsou doposud známy žádné existující partenogenetické formy (Vogt a kol., 2004a).



Obr. 9 – Rak mramorovaný *Procambarus virginalis*; převzato z www.biolib.cz; foto: Jan Lukavský (Ševčík).

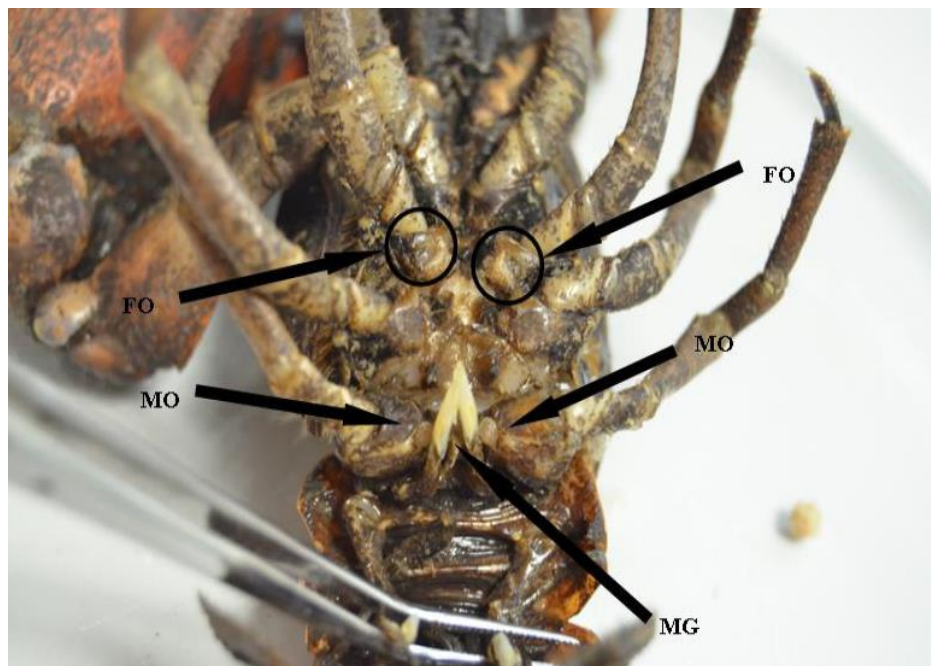


Obr. 10. – Rak pruhovaný *Faxonius limosus*; převzato z www.biolib.cz; foto: Zdeněk Hyan.

2.1.3. Intersexualita

Intersexualita je charakterizována přítomností samčích i samičích pohlavních znaků na stejném jedinci, u gonochoristů nebo i hermafroditů (Obr. 11). Může být omezena na reprodukční anatomii nebo rozšířena na morfologickou diferenciaci pohlavních žláz během vývojových stádií (Sagi a kol., 1996; Vogt, 2002; Noro a kol., 2008). Výskyt intersexuálních jedinců je obvykle okolo 1 % populace, ale jsou druhy, u kterých je četnost mnohem větší. Takovým příkladem tzv. častého intersexuálního jedince je rak červenoklepetý *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868), u kterého se může intersexualita vyskytovat až ve 14 % případů (Sagi a kol., 2002).

Dalšími příklady mohou být i rak signální *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852); nebo rody *Engaewa*, *Engaeus*, *Euastacus* a *Cherax* čeledi Parastacidae (Horwitz, 1988; Medley a kol., 1993; Sagi a kol., 1996; Rudolph a kol., 2007). Nicméně zde se jedná pouze o vzácný jev (Yazicioglu a kol., 2014).



Obr. 11. Pohlavní vývody obou pohlaví na jedinci raka signálního *Pacifastacus leniusculus*; **FO** - samičí vývody (*female opening*); **MO** - samčí vývody (*male opening*); **MG** - samčí gonopody (*male gonopods*); převzato z Yazicioglu a kol., 2014).

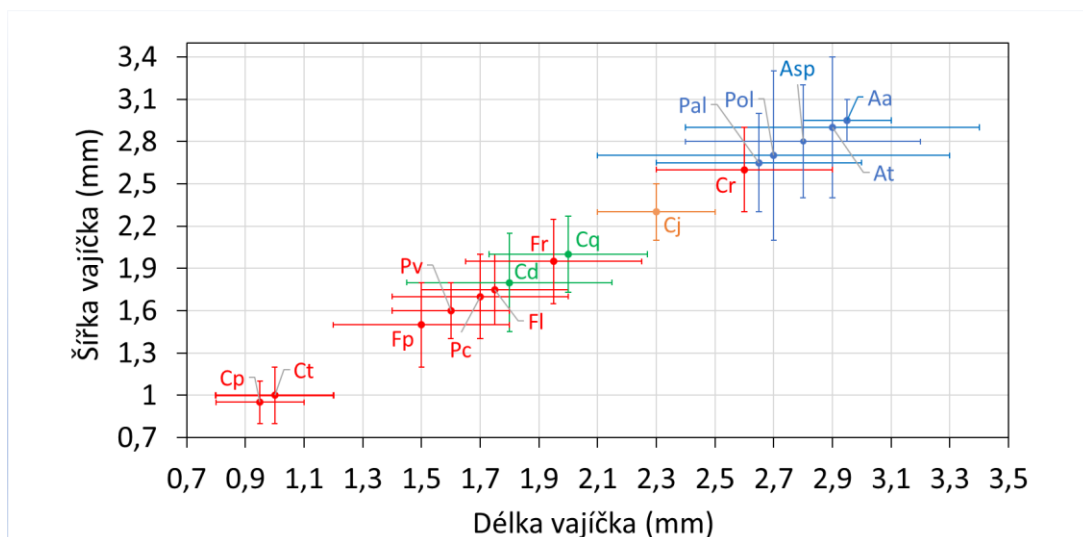
2.1.4. Hermafroditismus

Hermafroditismus se u raků objevuje jen zřídka. Práví hermafroditi jsou charakterizováni plně funkčními samičími a samčími reprodukčními orgány, a to buď současně v jednu chvíli, nebo postupně. Jediným doloženým druhem, u kterého byl prokázán hermafroditismus je rak malooký *Parastacus nicoleti* (Philippi, 1882) (Rudolf, 1995). U tohoto druhu jsou známy dva základní sexuální typy: primární samice a protandrický hermafrodit. Tito jedinci mají *ovotestes*, což znamená, že mohou produkovat spermie a postupně mohou přejít ze samce na samici a začít také tvořit vajíčka (Vogt, 2002).

2.2. Pohlavní buňky raků

2.2.1. Vajíčka

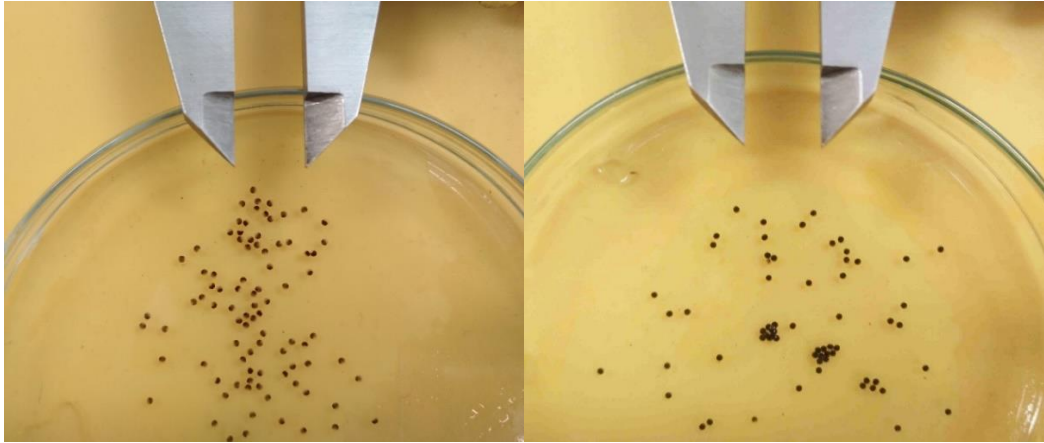
Vajíčka jsou u sladkovodních raků velikostně velmi variabilní. Obecně platí, že čím větší druh raka, tím větší velikost jeho vajíček, ale záleží také na životní strategii konkrétního druhu. Na Grafu 1. můžeme vidět znázorněnou délku a šířku 16 druhů raků ze všech čtyř račích čeledí. Z grafu je patrné, že z podchycených druhů se největší vajíčka (v průměru 2,5-3 mm) vyskytují u zástupců čeledi Astacidae. Je to dozajista dáno jejich ekologickou strategií – dosahují větších velikostí jedinců a mají relativně málo velkých vajíček. Naopak druhy z čeledi Cambaridae, kam spadají i druhy studované touto prací, mají velikost vajíček značně variabilní. Rak mexický společně s rakem brazoským mají vajíčka z této skupiny nejmenší. Je to dáno jejich velikostí těla, která je u těchto trpasličích raků maximálně do 5 cm, obvykle však podstatně méně. Vlastním pozorováním třech samic raka mexického a raka brazoského byla stanovena plodnost těchto druhů. Nejmenší samice raka mexického o velikosti hlavohruď 13,8 mm a vahou pouhých 0,9 g vykazovala pleopodální plodnost jen 46 vajíček o průměrné velikosti 1 mm. Naopak největší samice s hlavohruď dlouhou 14,9 mm a vahou 1,1 g měla plodnost 98 vajíček. U raka brazoského byla jednotlivá data velmi podobná. Délka hlavohruď nejmenší samice byla 12,6 mm a váha 0,7 g, největší samice měřila 13,4 mm a vážila 0,8 g. Pleopodální plodnost u nejmenší samice byla 65 vajíček a u největší 108 o průměrné velikosti 1 mm. V poměru velikosti těla a plodnosti je u těchto druhů celkem velký počet vajíček, což je dáno jejich malou velikostí (Obr 12.).



Graf 1. Obvyklé rozmezí velikosti vajíček vybraných druhů raků: **Astacidae** (značeno tmavě modře) – *Astacus astacus* (**Aa**; Skurdal a kol., 1994; Savolainen a kol., 1996; Vozgirdaitė, 1998), *Austropotamobius torrentium* (**At**; Maguire a kol., 2005), *Austropotamobius pallipes* (**Asp**; Carral a kol., 1994), *Pacifastacus leniusculus* (**Pal**; Mason, 1978; Kouba, 2007), *Pontastacus leptodactylus* (**Pol**; Alekhovich a Kol., 1996; Stucki, 1999); **Cambaridae** (značeno tmavě červeně) – *Cambarellus patzcuarensis* (**Cp**, vlastní pozorování), *Cambarellus texanus* (**Ct**, vlastní pozorování), *Cambarus robustus* (**Cr**; Hamr a kol., 1985), *Faxonius limosus* (**Fl**; Kozák a kol., 2006), *F. propinquus* (**Fp**; Corey 1987), *F. rusticus* (**Fr**; Loughman a kol., 2011), *Procambarus clarkii* (**Pc**; Alcorlo a kol., 2008), *Procambarus virginalis* (**Pv**; Seitz a kol., 2005; Holdich a kol., 2006); **Parastacidae** (značeno tmavě zeleně) – *Cherax destructor* (**Cd**; Kozák a kol., 2006), *C. quadricarinatus* (**Cq**; Rodríguez-González a kol., 2006.); **Cambaroididae** (značeno oranžově) *Cambaroides japonicus* (**Cj**; Nakata a kol., 2004).

Stále je ovšem velmi málo dat o velikostech vajíček největších sladkovodních raků zastupujících čeleď Parastacidae, především v případě rodu *Astacopsis*, jenž by tak byly ve vztahu k studiu velikosti spermií vs. velikosti vajíček rovněž zajímavými kandidáty. Velikost jejich vajíček totiž může přesahovat velikost 5 mm (Hamr 1990; Obr. 13.).

Získávání pohlavních produktů se u raků běžně neprovádí. Odběr račích vajíček a spermií je využíván zejména pro vědecké studie, a ne pro umělou reprodukci, jako je tomu například u ryb. U vajíček se odběr provádí po naklazení a následném upevnění vajíček na pleopodech samice. Samice s vajíčky jsou odchyceny z volných vod nebo pocházejí z odchovu. Samotný odběr vajíček musí být velmi šetrný, aby se vajíčka nepoškodila. K odběru vajíček z pleopodů samice se nejčastěji používá pinzeta, kterou opatrně strháváme vajíčka ze samičích pleopodů. Pokaždé špičku pinzety s vajíčky ponoříme do malého množství vody, aby se vajíčka oddělila od pinzety.



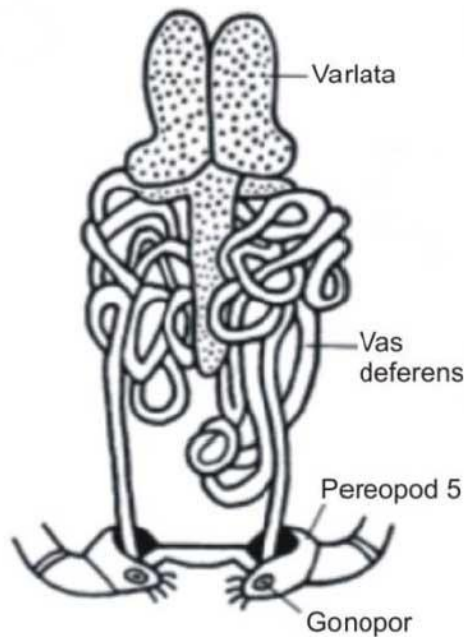
Obr. 12. Vlevo – Vajíčka raka mexického *Cambarellus patzcuarensis*; Vpravo – Vajíčka raka brazoského *Cambarellus texanus*; měřítko nastaveno na 1 cm; foto: Autor).



Obr. 13. Samice zástupce rodu *Astacopsis* – rak tasmánký *Astacopsis gouldi* Clark, 1936 s jedněmi z největších vajíček račí fauny (Hamr 1990).

2.2.2. Spermie

Spermie raků se získávají podstatně složitěji než vajíčka. K odběru spermií k následnému pozorování nebo jinému použití se provádí odběr např. pomocí pitvy nebo elektrostimulace (Kubec, 2012). Při disekci se u samců provádí odběr tzv. *vasa deferentia* (Obr. 14.) což je část chámovodu, ve které jsou obsaženy zralé spermie a je zodpovědná za vedení spermií směrem k vývodu na povrchu těla, kapacitaci a obalování ochrannými vrstvami (Vogt, 2002; Niksirat a kol., 2014).



Obr. 14. Celkový pohled na samčí pohlavní orgány a na *vasa deferentia* (Holdich a kol., 1988, upraveno)

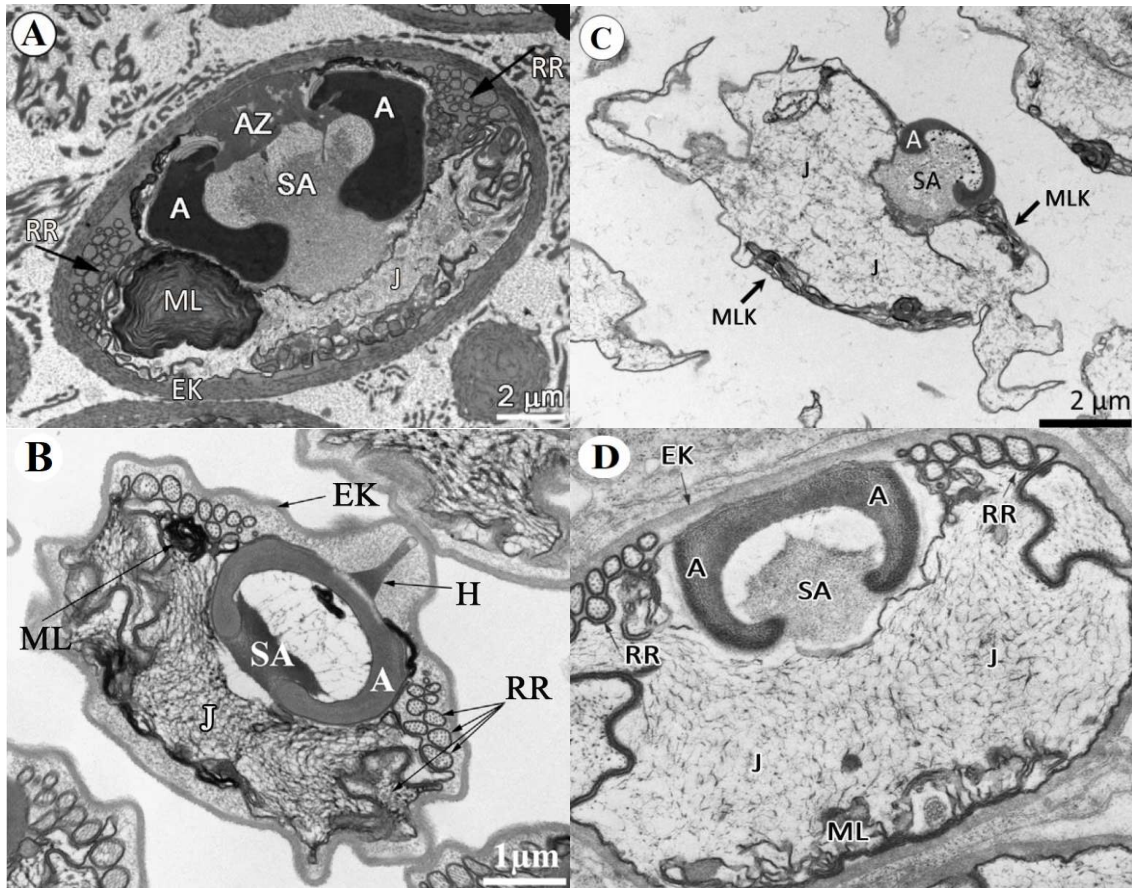
Spermie korýšů v samičí pohlavní soustavě neplavou dlouhé vzdálenosti, jako je tomu u jiných druhů s vnitřním oplodněním nebo ve vodním prostředí jako u druhů s vnějším oplodněním. Spermie korýšů jsou totiž nepohyblivé (Tudge 2009; Poljaroen a kol., 2010). Každá spermie má tzv. akrozom (Obr. 15), což je struktura, která umožňuje vpravení genetického materiálu samce do vajíčka přes mikropyle. Samčí pohlavní buňka je charakteristická několika organelami, ze kterých se skládá.

Ultrastruktura spermií obecně zahrnuje akrozom (akrozomální komplex) a jádro v přední, resp. zadní části buňky. Dále jsou přítomna tzv. radiální ramena (vyjma čeledi Parastacidae), které se obepínají kolem akrozomu a membránových lamel. Celá buňka je pak uzavřena do tzv. extracelulární kapsle (opět vyjma zástupců čeledi Parastacidae; Obr. 15).

Především v posledních letech proběhlo několik studií pojednávajících o ultrastrukturách račích spermií. Druhy, které byly doposud zkoumány jsou uvedeny v této tabulce (Tab. 2.).

Tab. 2. Seznam druhů, studovaných pro ultrastrukturu spermií.

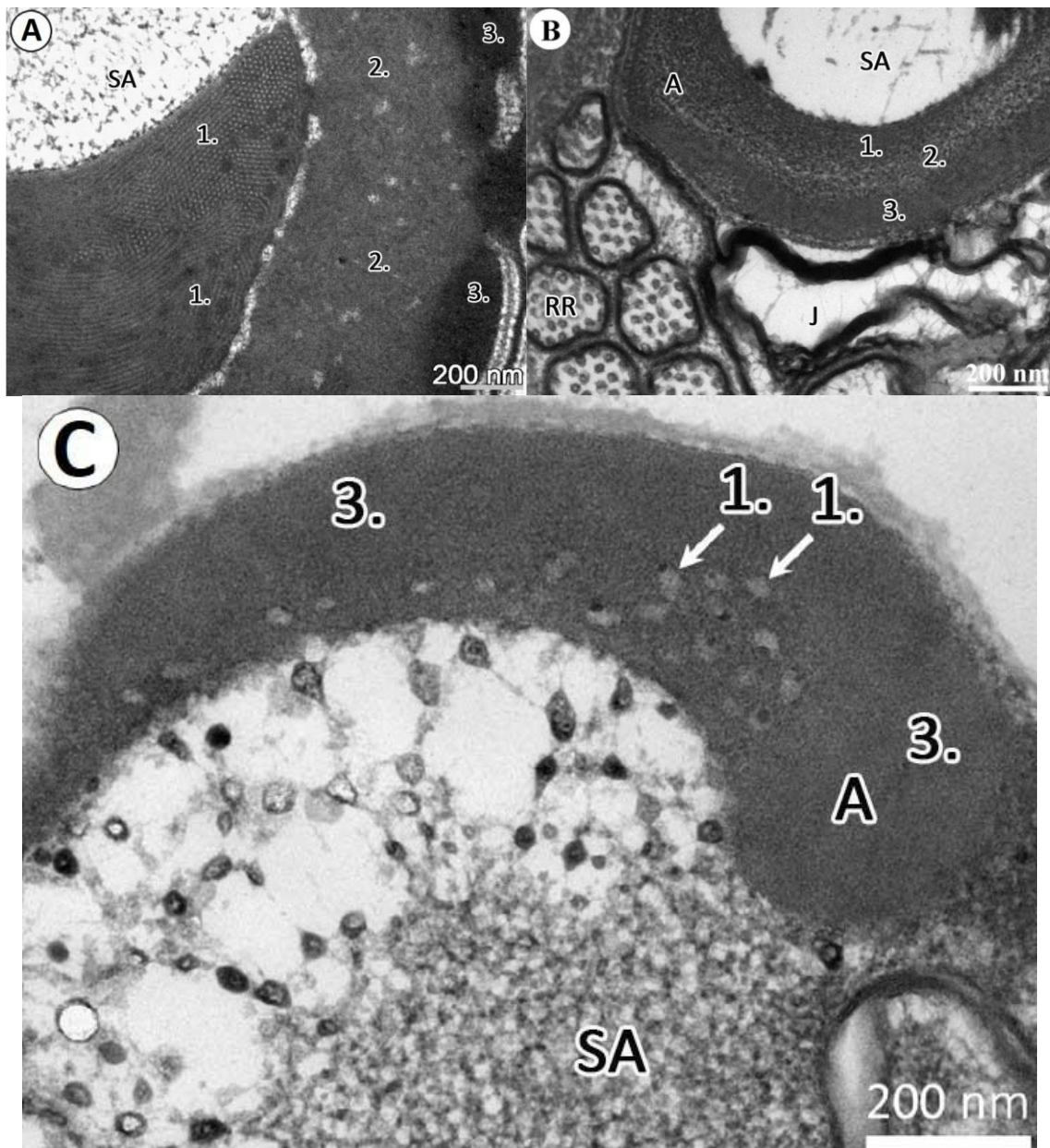
Druh	Čeľad'	Reference
<i>Astacus astacus</i>	Astacidae	Pochon-Masson, 1968; López-Camps a kol., 1981; Niksirat a kol., 2013b; Niksirat a kol., 2016.
<i>Austropotamobius torrentium</i>	Astacidae	Niksirat a kol., 2013b.
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Astacidae	Dudenhausea a kol., 1979; 1982; 1983; Niksirat a kol., 2013a; Yazicioglu a kol., 2014.
<i>Pontastacus leptodactylus</i>	Astacidae	Eliakova a kol., 1966; Niksirat a kol., 2013b.
<i>Cambaroides japonicus</i>	Cambaroididae	Yasuzumi a kol., 1961; 1966.
<i>Cambarus robustus</i>	Cambaridae	Yazicioglu a kol., 2016.
<i>Faxonius limosus</i>	Cambaridae	Niksirat a kol., 2013a.
<i>Faxonius propinquus</i>	Cambaridae	Yazicioglu a kol., 2016.
<i>Faxonius rusticus</i>	Cambaridae	Berrill a kol., 1982; Snedden, 1990; Yazicioglu a kol., 2016.
<i>Procambarus alleni</i>	Cambaridae	Kouba a kol., 2014.
<i>Procambarus clarkii</i>	Cambaridae	Moses, 1961a, b; Niksirat a kol., 2013a; Dong a kol., 2014.
<i>Cherax destructor</i>	Parastacidae	Jamieson, 1991; Jerry, 2001; Kouba a kol., 2015.
<i>Cherax tenuimanus</i>	Parastacidae	Beach a kol., 1987
<i>Cherax albidus</i>	Parastacidae	Beach a kol., 1987
<i>Cherax quadricarinatus</i>	Parastacidae	López-Greco a kol., 2007; López-Greco a kol., 2008; An a kol., 2011; Kouba a kol., 2015.



Obr. 15. Sagitální pohled na buňky čtyř čeledí. **A:** Astacidae – spermie raka říčního *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758); **B:** Cambaridae – spermie raka červeného *Procambarus clarkii* (Girard, 1852); **C:** Parastacidae – raka červenoklepetého *Cherax quadricarinatus*; **D:** Cambaroididae – rak japonský *Cambaroides japonicus* (De Haan, 1841). **A:** akrozom hlavní tělo; **AZ:** apikální zóna; **SA:** subakrozom; **RR:** radiální ramena; **ML:** membranózní lamela; **MLK:** membranózní lamelární komplex; **J:** jádro; **EK:** extracelulární kapsle uzavírající buňku. (Převzato z Yasuzumi a kol., 1966; Niksirat a kol., 2013a, b; Kouba a kol., 2015; upraveno autorem).

Akrozomální komplex je jednou z nejvýznamnějších organel vyskytující se v přední části samčí pohlavní buňky (spermie). U všech čtyř račích čeledí je tento komplex rozdělený na dvě hlavní části: akrozom, který vypadá jako převrácená mistička nebo helma a tzv. subakrozom, který vyplňuje centrální zónu akrozomu a připomíná hlavičku od hřebíku (Yazicioglu, 2016; Obr. 15). Akrozom je zjevně nejsložitější organelou račí samčí pohlavní buňky. Samotný akrozom při akrozomální reakci generuje nezbytnou pro to, aby jádro spermatu proniklo do cytoplazmy oocytu (Brown, 1966; více v kapitole radiální ramena) a došlo tak k samotnému oplození. Každý akrozom je charakteristický morfologickými znaky a biometrií. Jejich kombinací lze následně rozlišit jednotlivé druhy či skupiny sladkovodních raků.

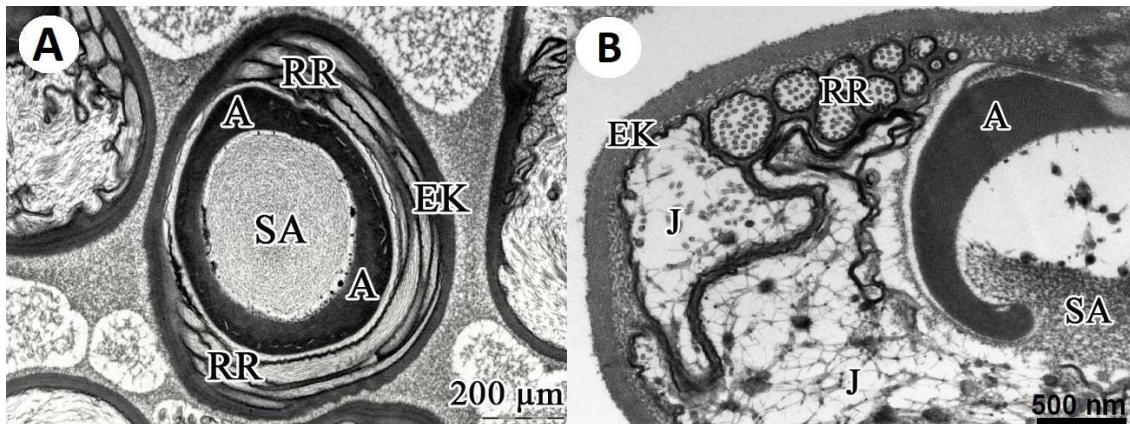
Akrozom je u všech studovaných druhů tvořený u Astacoidea (Astacidae, Cambaridae a Cambaroididae) třemi (Obr. 16a, b) a u Parastacidae dvěma vrstvami filament o různých elektronových hustotách (Obr. 16c). Umístění jednotlivých vrstev se může druhově lišit. U Astacidae, Cambaridae a Cambaroididae je nejvíce elektronově hustá vnitřní vrstva s paralelními vlákny táhnoucí se od základny akrozomu až do přední části akrozomu. U čeledi Astacidae se přední část označuje jako tzv. apikální zóna, která je pro tuto čeleď jedinečná (Obr. 15a). Předpokládá se, že apikální zóna u těchto spermií je jasně diferencovaná zóna, která funguje jako průchod umožňující přesun následných jaderných a genetických materiálů do vaječné buňky během akrozomální reakce. Následuje střední vrstva s nižší hustotou než vnitřní, ale naopak vyšší než u vrstvy nejvzdálenější (vnější; Yasuzumi a kol., 1961; Yasuzumi a kol., 1966; Niksirat a kol., 2013a, b). U Parastacidae je vnější vrstva o poznání méně hustá než vrstva vnitřní. U této čeledi můžeme v elektronově hustší vrstvě pozorovat i oblasti s různými hustotami tvořené shluky fibrilárních (vláknitý) a granulárních sítí (Kouba a kol., 2015; Obr. 16c). Vlákna uvnitř nejvnitřnějších a nejhustších vrstev hlavního těla akrozomu mohou mít důležitou funkci během akrozomální reakce. Pravděpodobně je tato oblast zdrojem enzymů, které jsou po přesunu akrozomu v přímém kontaktu s chorionem vajíčka (Talbot a kol., 1980). Tvary jednotlivých akrozomů se mohou druhově lišit např. akrozom raka říčního může mít akrozom o něco delší než ostatní druhy raků (Niksirat a kol., 2013b), nebo u čeledi Cambaroididae rak japonský a Cambaridae rak červený (Obr. 15b) a rak floridský *Procambarus alleni* (Faxon, 1884) mají na akrozomu rohovitý výrůstek (Yasuzumi a kol., 1966). Tento hrot je lokalizovaný na přední straně akrozomu a je k němu připojen pomocí translucenční základny, která se tak jeví jako tenká bílá oblast. Průměrná délka hrotu u raka červeného se pohybuje okolo 0,48 μm . Uvádí se ale, že je hrot přítomen jen v momentě, kdy se spermie nachází ve *vasa deferentia*, tzv. když se nejedná o plně zralou spermii (Niksirat a kol., 2013a). Subakrozom u všech druhů vyplňuje centrální zónu akrozomu. Je tvořený vločkovitým a elektronově prosvětleným materiálem s menší elektronovou hustotou. Přiléhá těsně k jádru, od kterého je jasně oddělen dvojrstvou membránou (Yasuzumi a kol., 1966; Niksirat a kol., 2013a, b; Kouba a kol., 2015).



Obr. 16. Vrstvy filament lemující akrozoom. **A:** rak kamenáč *Austropotamobius torrentium* (Paula von Schrank, 1803); **B:** rak červený *Procambarus clarkii*; rak ničivý *Cherax destructor* Clark, 1936. **1.** vnitřní nejméně hustá vrstva vláknitých filament (u raka ničivého značeno šipkami); **2.** střední méně hustá vrstva vláknitých filament; **3.** vnější nejhustší vrstva vláknitých filament. **A:** akrozoom hlavního těla; **SA:** subakrozoom; **J:** jádro. (Převzato z Niksirat a kol., 2013a, b; upraveno autorem).

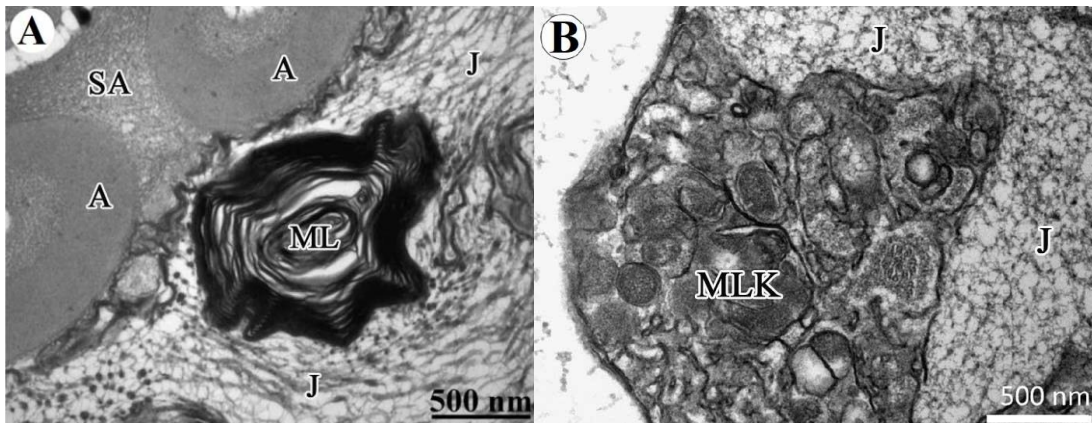
Radiální ramena jsou přítomna u nadčeledi Astacoidea, ale u druhů rodu *Cherax* studovaných z čeledi Parastacidae doposud nebyla nalezena (Beach a kol., 1987; Kouba a kol., 2015). Jedná se o provazce sestavené z mikrotubulů, které vycházejí z jádra a stáčí se kolem hlavního těla akrozoomu. Těchto ramen se kolem akrozoomálního komplexu ovinuje hned několik (Yazicioglu, 2016; Obr. 17). Hlavní funkce radiálních

ramen nastává v době, kdy dochází ke kladení vajíček. Spermie jsou uvolněny ze spermatoforu, který se začne rozpouštět a spermie se uvolňují do prostředí. Následně se radiální ramena obepínající akrozom rozevřou a připojují se k povrchu vajíčka. Poté dochází k rychlému rozevření akrozomální oblasti a přes chorion (vnější obal vajíčka) a dochází k posunu jádra spermie směrem k vajíčku. Postupně se takto přenese veškerý samčí genetický materiál do vajíčka samice (Brown, 1966; Vogt, 2002).



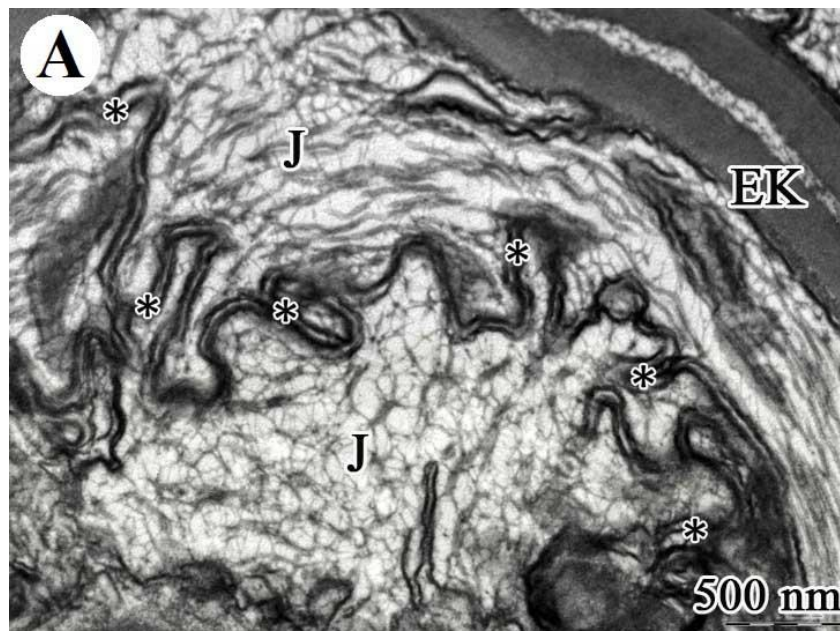
Obr. 17. Pohled na spermatozoa a radiální ramena. **A:** rak mexický *Cambarellus patzcuarensis* z dorzálního (horního) pohledu; **B:** rak floridský *Procambarus alleni* ze sagitálního (na řezu) pohledu. **A:** akrozom hlavní tělo; **SA:** subakrozom; **RR:** radiální ramena; **J:** jádro; **EK:** extracelulární kapsle uzavírající buňku (Převzato z Kouba a kol., 2014; Autor; upraveno autorem).

Membránové lamely (*membranous lamella*) jsou u všech čtyř čeledí raků přítomné jako náhodně lokalizované asymetrické struktury uvnitř samčí pohlavní buňky. Jedná se o shluky a svazky spletítych membrán, které jsou laterálně umístěny od akrozomu a jsou velmi dobře viditelné (Yazicioglu, 2016 Obr. 18). U čeledi Parastacidae se může stát, že jsou přítomny i dvě menší lamely, které jsou obvykle lokalizovány v membránovém lamelárním komplexu poblíž akrozomu (Kouba a kol., 2015; Obr. 18b). Tyto lamely vznikají alterací (změnou) a transformací několika mitochondrií během spermatogeneze. Jejich základní funkcí je schopnost dodávat energii račí spermii (Anderson a kol., 1967).



Obr. 18. Membranózní lamela a membranózní lamelární komplex. **A:** rak pruhovaný *Faxonius limosus*; **B:** rak ničivý *Cherax destructor*. **A:** akrozom hlavní tělo; **SA:** subakrozom; **J:** jádro; **ML:** membranózní lamela; **MLK:** membranózní lamelární komplex. (Převzato z Niksirat a kol., 2013b; Kouba a kol., 2014; upraveno autorem).

Oblast **jádra** je umístěna v protilehlé části od akrozomu. Jsou zde uloženy veškeré jaderné a genetické materiály. Tato část v buňce zaujímá poměrně velkou oblast. Prodloužená radiální ramena pronikají do jádra a procházejí jím a jsou zde pozorovány (vyjma Parastacidae) jako paralelní sítě mikrotubulů a vláken v zrnitém materiálu jádra. Jaderná část je oddělena od ostatních částí dvojitou membránou (López-Camps, 1981; Niksirat a kol., 2013b; Yazicioglu, 2016; Obr. 19).



Obr. 19. Jaderné území raka mexického *Cambarellus patzcuarensis* ohraničené dvojitou membránou. **Černé bíle ohraničené hvězdičky:** znázorňují dvojitou jadernou membránu. **J:** jádro (nukleus); **EK:** extracelulární kapsle uzavírající buňku (foto: Autor).

Samotná samčí pohlavní buňka je uzavřena do extracelulární kapsle (vyjma čeledi Parastacidae, u které kapsle chybí), která uzavírá všechny orgány do jednoho kompaktního celku. Další cytoplazmatické orgány, jako jsou například centrioly nebo mitochondrie jsou velmi vzácné (Niksirat a kol., 2013a; Kouba a kol., 2015).

3. Materiál a metodika

3.1. Odběr vzorků experimentálních raků

Pro tuto studii jsem použil tři dospělé samce raka mexického a raka brazoského původem z akvaristického chovu. Samce jsem navzorkoval v únoru 2020 ve Výzkumném ústavu rybářském a hydrobiologickém JU ve Vodňanech (VÚRH), kde byly tyto druhy dočasně odchovány. Samce jsem použil na získání samčího generačního materiálu (spermatofory). Tyto vzorky jsem odebral pro přípravu tzv. transmisní elektronové mikroskopie (TEM) v Laboratoři elektronové mikroskopie, Parazitologického ústavu, Biologického centra AV ČR, v. v. i.

U jednotlivých samců jsem nejdříve změřil délku hlavohrudi a těla a následně stanovil i celkovou hmotnost. K měření délky jsem použil posuvného digitálního měřítka s přesností na desetinu mm. Hmotnosti raků jsem stanovil pomocí vah s přesností na desetiny gramu. Poté jsem samce po dobu 10 minut vložil do nádoby s tajícím ledem, kde proběhlo jejich znehybnění a anestezie. Následně pod binolupou proběhla disekce, při které jsem odebral koncové části tzv. *vasa deferentia* (Obr. 14.) poblíž výstupných otvorů (*gonopory*) pohlavních orgánů, kde jsou přítomny zralé spermie viz. podkapitola 2.2.2. Po disekci jsem odebrané vzorky vložil do vialek (Obr. 20.) s rozmrzlým roztokem 2,5% glutaraldehydu v 0,2 M fosfátovém pufru, kde byly uloženy 48 hodin při teplotě okolo 4 °C a tímto fixovány. Po uplynutí 48 hodin jsem vzorky přenesl do laboratoře, kde jsem započal přípravu vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii.

3.1.1. Příprava pro transmisní elektronovou mikroskopii

V laboratoři jsem se po celou dobu přípravy řídit stanoveným postupem (Obr. 21). Veškerou práci vedenou v laboratoři jsem prováděl pod zapnutou digestoří kvůli zdravý škodným výparům z užívaných roztoků. Z každého vzorků připraveného ještě na pracovišti VÚRH jsem pomocí tzv. "kapátka" (Obr. 22.) odsál předchozí roztok. A následně jsem vzorek vložil do tzv. vypíracího roztoku (Obr. 23.), ve kterém jsem je

nechal 15 minut stát. Po uplynutí 15 minut jsem odsál starý vypírací roztok a vložil jsem nový. Stejný postup jsem zopakoval celkově třikrát.



Obr. 20. Vialky (mikrozkumavka) pro přípravu vzorků
(Foto: Autor).



Obr. 22. Kapátka na výměnu roztoků
(Foto: Autor).

PŘÍPRAVA VZORKU PRO TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP

- 2,5% GA v 0,2M pufru	nejméně 4hod
- vypírací roztok	3 x 15min
- pufr + 4% roztok OsO ₄ 1:1	rostliny 3 - 4hod
	živočišný materiál 2 hod
- vypírací roztok	3 x 15min
- 30% aceton	15 min
- 50% aceton	15min
- 70% aceton	15min (možnost přerušit přes noc)
- 80% aceton	15min
- 90% aceton	15min
- 95% aceton	15min
- 100% aceton	15min
- pryskyřice + aceton 1:2	1hod
- pryskyřice + aceton 1:1	1hod
- pryskyřice + aceton 2:1	1hod
- čistá pryskyřice = exikátor	24hod
- zaléváme do zalévacích formiček a dáme do termostatu	24hod

Takto připravený materiál krájíme na poloténkové fezy pomocí ultramikrotomu a dále potom na ultratenké fezy. Poloténkové fezy barvíme na sklíčku pomocí toluidinové modře. Ultratenké fezy kontrastujeme na sítkách pomocí uranylacetátu a lead citrátu.

Velmi malé vzorky nebo suspence zaléváme před a nebo těsně po fixaci do 2% agarů. Agar nejdříve zahřejeme asi na 100°C a necháme vychladnout na 62°C. Při 62°C zaléváme, potom krájíme na malé kousky a zpracováváme standardní metodou.

PRANÍ SÍŤEK

Nové sítky se před použitím musí dokonale umýt.

50% kyselina octová	5min
jarová voda	5min
destilovaná voda	5min promýt
aceton	5min
ultrazvuk	5min

usušit na filtračním papíře
Takto umyté sítky používáme pro nanášení fezů.

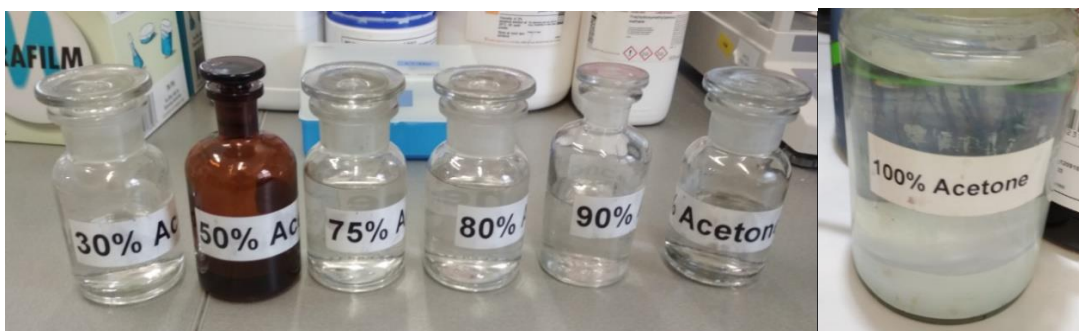
Obr. 21. Protokol na přípravu vzorku pro transmisní elektronovou mikroskopii TEM,
(Foto: Autor).

Po uplynutí posledních 15 minut jsem pro další fixaci nahradil vypírací roztok v poměru 1:1 4% oxidem osmičelým (OsO_4) a pufrem (vypírací roztok). Takto zafixované vzorky jsem následně nechal stát po dobu alespoň dvou hodin. Po dvouhodinové fixaci jsem zopakoval stejný proces jako před fixací – vypírání pomocí vypíracího roztoku po dobu 3x15 minut.



Obr. 23. Vypírací roztok (Foto: Autor).

Po vypíracím procesu jsem začal proces dehydratace vzorků pomocí acetonové řady. Na dehydrataci jsem využil acetonové řady (30, 50, 70, 80, 90, 95%) a nakonec i 100% aceton (Obr. 24.). Jednotlivé acetonové roztoky jsem ponechal se vzorkem vždy 15 minut. V intervalu 15 minut jsem starý roztok odsál a nahradil více procentním acetonem. Na úrovni 70% acetonového roztoku byla možnost vzorek nechat stát při teplotě 4 °C po celou noc a pokračoval jsem až další den ráno.



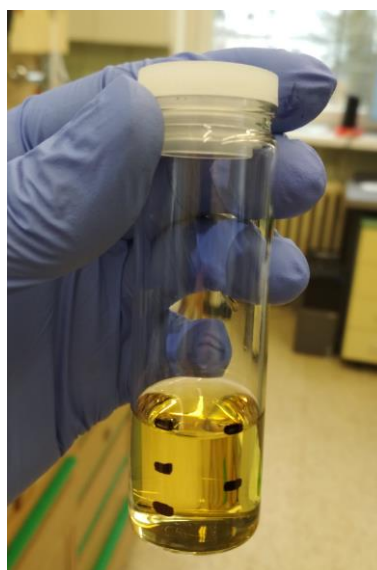
Obr. 24. Acetonová řada pro dehydrataci vzorků (Foto: Autor).

Po uplynutí posledních 15 minut a odebrání 100% acetonu jsem ke vzorku přidal tzv. EPON (epoxidová pryskyřice; Obr. 25.). Epon jsem do vzorku přidával ve třech intervalech po dobu 1 hodiny. První interval v poměru 1:2 – pryskyřice + 100% aceton, následně v poměru 1:1 a nakonec v poměru 2:1 (Obr. 26). Na úplný závěr jsem ke vzorku přidal čistou pryskyřici a vialky jsem nechal otevřené. Otevřené vialky jsem vložil do polystyrénového držáku a následně uložil do tzv. exikátoru (Obr. 27), kde byly ponechány celou noc.



Obr. 25. EPON – epoxidová pryskyřice aceton

(Foto: Autor).



Obr. 26. Pryskyřice (EPON) + 100%

(Foto: Autor).

Další den ráno jsem vzorky opatrně vyndal a vložil do připravené zalévací gumové formičky (Obr. 28). Jednotlivé doky formičky jsem naplnil čistou pryskyřicí a do ní vložil samotné vzorky, které jsem lokalizoval ke kraji doku. Formičku se zalitými vzorky jsem následně vložil do termostatu, kde jsem vzorky nechal dva dny při teplotě 62 °C, aby došlo k plnému zatuhnutí pryskyřice.

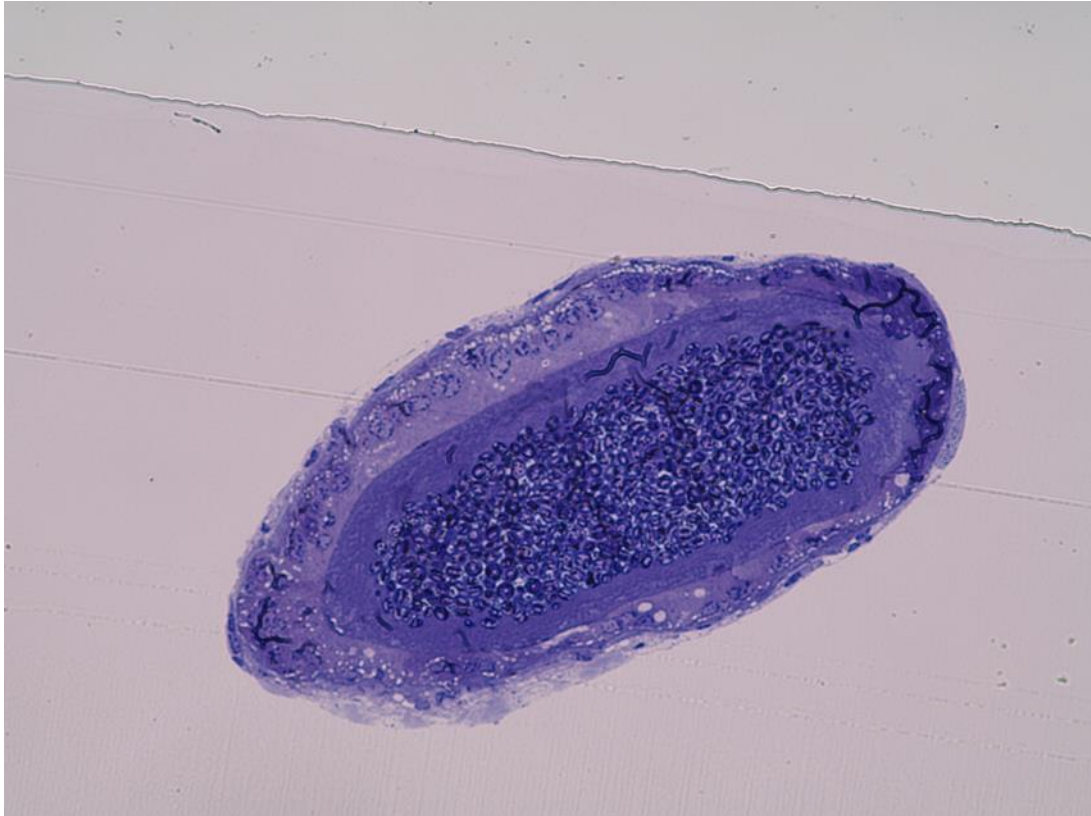


Obr. 27. Exikátor (Foto: Autor). **Obr. 28.** Formička se vzorky (Foto: Autor).

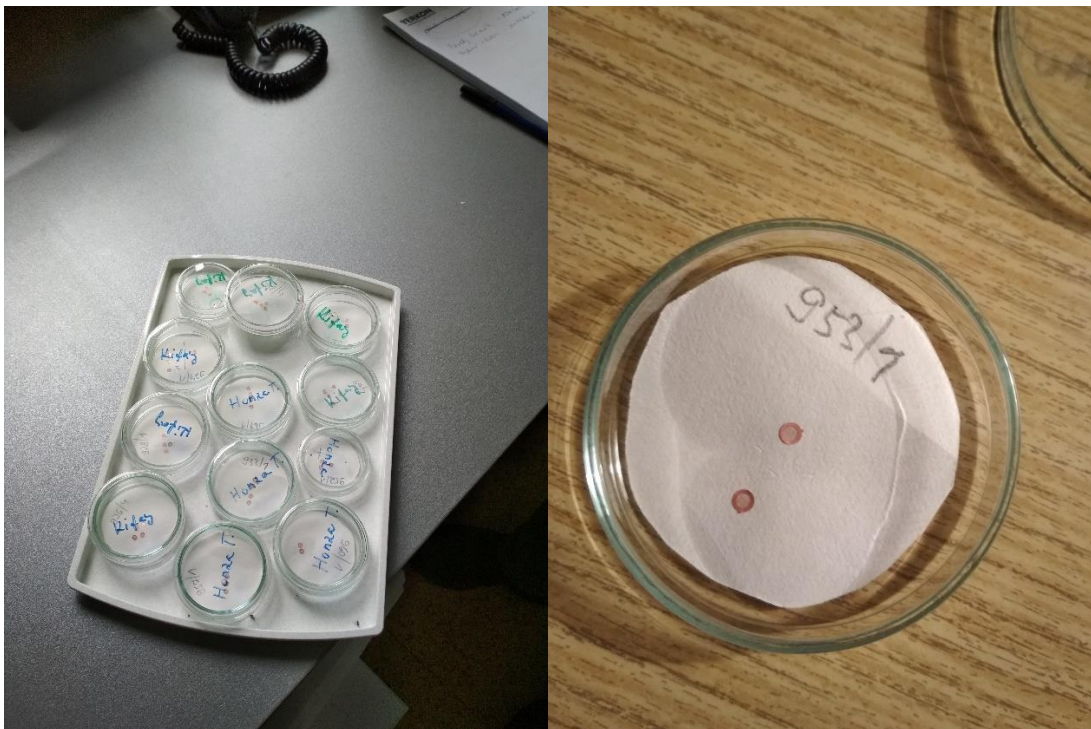
3.1.2. Finální zpracování vzorků pro TEM

Po dokončení přípravy a po vyjmutí jednotlivých vzorků z formičky byli v laboratoři vzorky dále zpracovány odborníky specializovanými na elektronové mikroskopii.

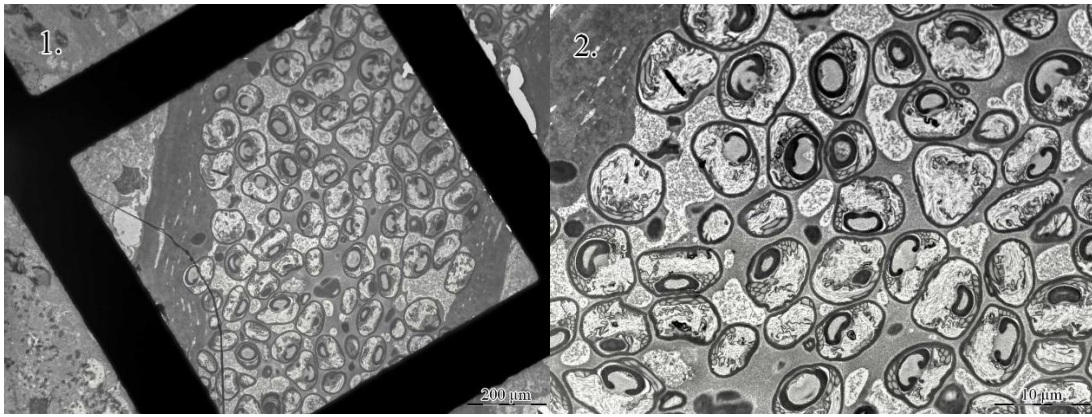
Zpracování probíhalo v nařezání tzv. polo-tenkých řezů jednotlivých vzorků (Obr. 29), kde byli lokalizovány zájmové oblasti. Po lokalizaci zájmové oblasti bohaté na spermie byli provedeny ultratenké řezy, které se následně umístili na měděné mřížky (Obr. 30) určené k samotnému pozorování na transmisním elektronovém mikroskopu. Vzorky se nejprve nalepí na podložní sklíčko a poté se na ně přilepí jednotlivé terčičky s mřížkami. Následně se sklíčko ponoří do leptadla a výsledkem leptání je terčik s mřížkou a vzorkem. Ultratenké řezy na měděných sítkách po vložení do mikroskopu umožňovaly přibližovat a zостřovat si jednotlivé buňky a zájmové struktury (Obr. 31). Na závěr už proběhlo vlastní zdokumentování jednotlivých zájmových oblastí a struktur pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM-101 (JEOL, Tokyo, Japan; Obr. 32), které jsou uvedené v kapitole Výsledky.



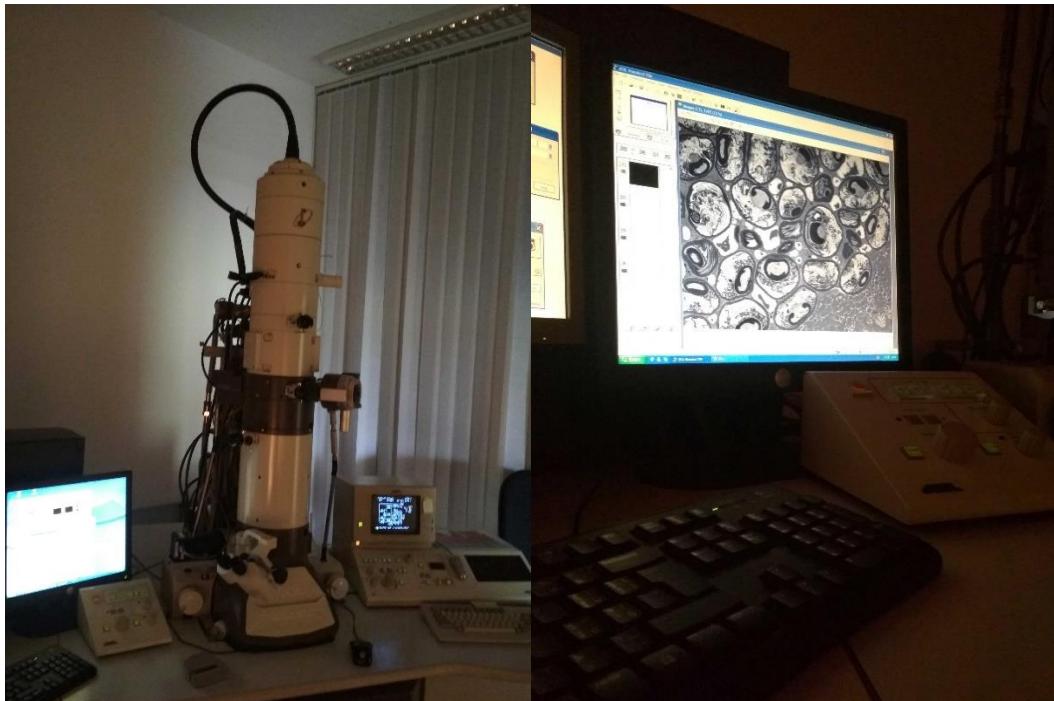
Obr. 29. Příklad polo tenkého řezu vzorku raka mexického *Cambarellus patzcuarensis*. Uprostřed je lokalizované velké množství spermií. Charakteristické jsou i tři ochranné vrstvy spermatoru viz. Obr.10 (Foto: Autor).



Obr. 30. Ultratenké řezů vzorků na měděných mřížkách připravené pro transmisní elektronovou mikroskopii (Foto: Autor).



Obr. 31. (1) Pohled na shluk spermií s jasně viditelně ohraničenou měděnou síťkou. (2) Přiblížený shluk buněk předchozího snímku z 200 na 10 μm. (Foto: Autor).

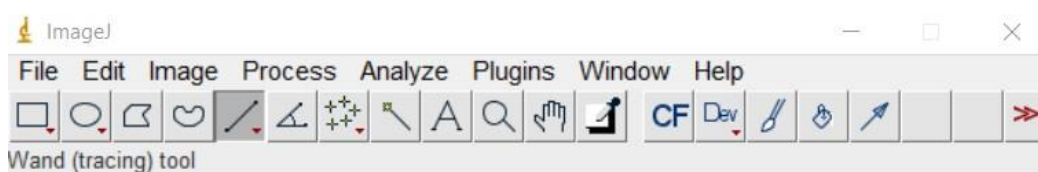


Obr. 32. Transmisní elektronový mikroskop JEOL JEM-10 a software na fotografování (Foto: Autor).

3.2. Postup měření biometrie spermií

Pro měření biometrie račích akrozomu jsem využil fotografií pořízených mikroskopem v laboratoři. Pro měření jsem pro každý druh vyfotil několik fotografií pohlavních buněk nevzorkovaných samců. Konkrétně pro raka mexického to bylo 63 a pro raka brazoského 40 pohlavních buněk.

Pro samotné měření délky a šířky akrozomu jsem využil softwaru ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), což je nástroj mimo jiné umožňující měřit vzdálenosti na fotografii pomocí transformovatelných linií (rovné čáry), u kterých je následně možnost změření vzdálenosti (Obr 33).



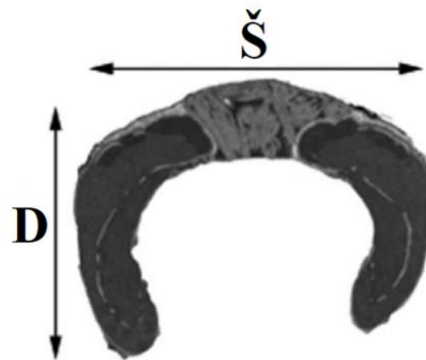
Obr. 33. Software ImageJ s tabulkou nástrojů pro měření vzdáleností (Foto: Autor).

Důležité pro takové měření bylo nejprve vytvořit měřítko (bar) lokalizované v pravém dolním rohu fotografie. Měřítko na fotografii jsem pomocí rovné čáry pouze překryl a změřil v sektoru analýza – “*Measure*“. Výslednou hodnotu jsem si zapsal. Stejným způsobem jsem změřil délku i šířku akrozomu. Výsledné hodnoty délky a šířky jsem pomocí jednoduchého vzorce přepočtl podle naměřeného měřítko (Obr. 34). Stejný postup jsem provedl u všech fotek pohlavních buněk. Tři hodnoty značené ve sloupci “*Length*“ pro měřítko, délku a šířku na fotografii (Obr. 35) pak byly přepočteny na reálné rozměry zájmových struktur.

Podle Jamieson (1991) a Tudge a kol. (2001) výsledky měření akrozomů u spermií sladkovodních raků ukazují, že i přes určité podobnosti může být pro rozlišení různých druhů raků podle akrozomu užitečná i kombinace různých typů rozměrů (délka, šířka a poměr délka: šířka akrozomu). Poměr délky a šířky akrozomu byl použit jako základní faktor k rozdělení raků do tří kategorií podle tvaru akrozomu. Základem výpočtu je vydělení délky akrozomu šířkou akrozomu, jehož výsledkem je číslo pohybující se okolo jedné. Základní kategorie se pak rozlišují na tzv. stlačené (<1), sférické (1) a protáhlé (>1) akrozomy.

Získané biometrické údaje o akrozomech studovaných druhů byly nejprve testovány na normalitu a homoskedasticitu (rozptyl je nezávislý na parametru) pomocí

Kolmogorov-Smirnovových, resp. Levenových testů a poté vzájemně porovnány pomocí Studentova t-testu. V rámci diskuse byly tyto porovnávány i s daty z dříve studovaných druhů raků (Yazicioglu a kol., 2016). S ohledem na nesplnění předpokladů pro využití parametrických testů byl pro tento účel využit neparametrický Kruskal-Wallisův test následovaných vícenásobným porovnáním průměrného pořadí všech skupin. U všech statistických testů byly za statisticky významné považovány hodnoty $p < 0,05$. Analýzy byly prováděny v programu Statistica software 12.0 pro Windows (StatSoft, Praha, Česká republika). Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka.



Obr. 34. Rozměry akrozomu. Š: šířka; D: délka. Převzato z (Niksirat a kol., 2013b; Jamieson, 1991) a upraveno autorem.

The screenshot shows the 'Results' window in ImageJ software. It contains a table with the following data:

	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	0.005	51.552	0	127.500	0	1
2	0.010	119.533	49.944	224.000	45.616	2.027
3	0.005	119.675	65.180	185.873	137.684	0.931

Obr. 35. Software ImageJ s tabulkou výsledků, kde jsou důležité hodnoty ve sloupci “Length“. **1.** hodnota bar; **2.** hodnota šířky akrozomu; **3.** hodnota délky akrozomu (Foto: Autor).

4. Výsledky

4.1. Ultrastruktura spermie raka mexického a raka brazoského

U těchto dvou druhů je samčí pohlavní buňka uzavřena do tzv. extracelulární kapsle, která jí ohraničuje (Obr. 36; 37).

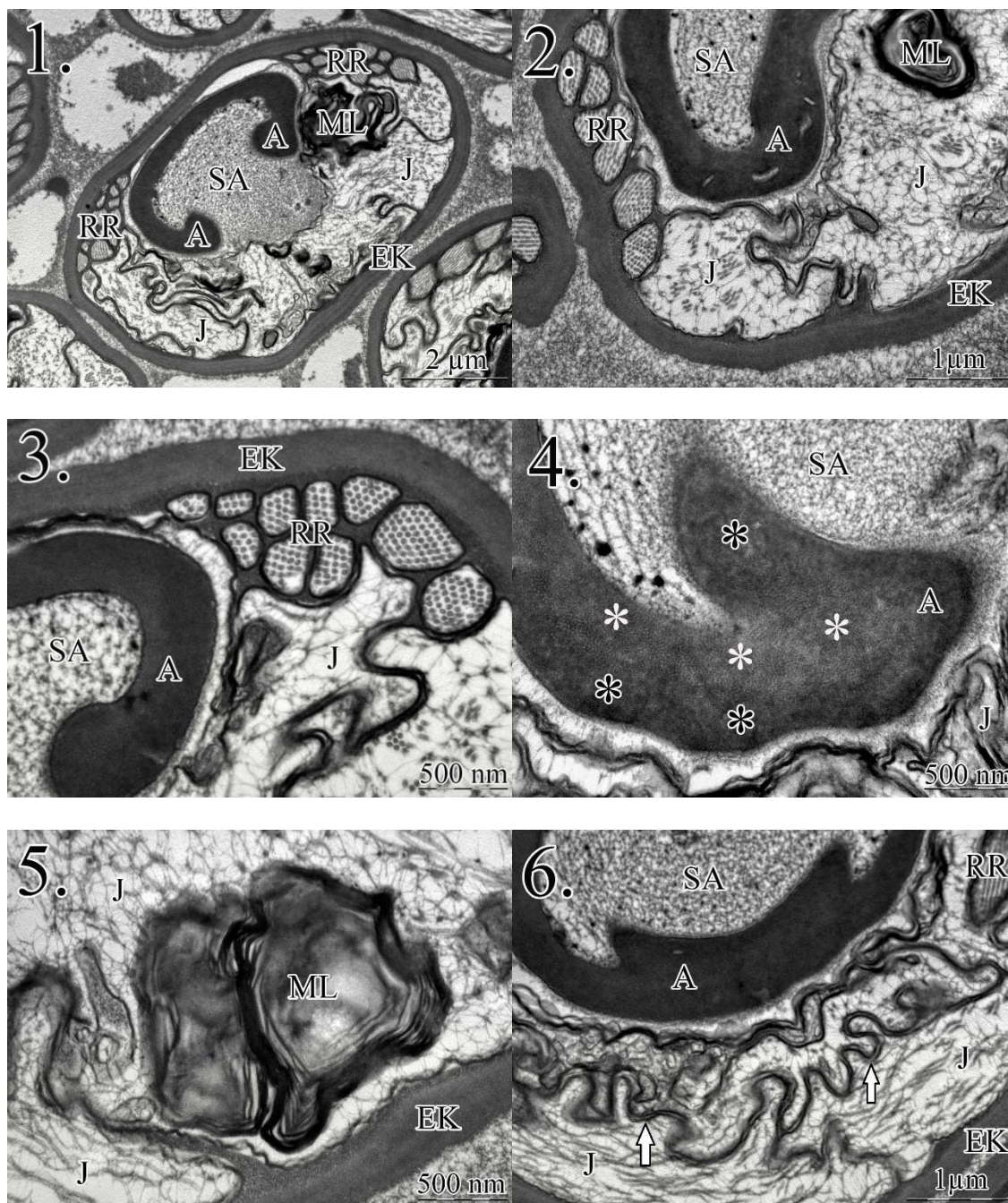
Dominantní strukturou je akrozomální komplex rozdělený na dvě hlavní části: akrozom a subakrozom (Obr. 36, 37). U obou druhů akrozom zaujímá kalíškovitý tvar a je tvořený zřetelně odlišnými vrstvami o různých elektronových hustotách. Vnitřní (hlubší) světlejší vrstva s nižší elektronovou hustotou je lokalizovaná blíže k subakrozomu. Vnější více povrchová tmavší vrstva vzdálenější od subakrozomu, kde filameny neprostupují je charakterizovaná vysokou hustotou elektronových filament táhnoucí se od základny akrozomu až k přední části akrozomu (Obr. 36; 37).

Subakrozomová zóna ve tvaru hlavičky hřebíku vyplňuje centrální zónu akrozomu a u obou druhů jasně přiléhá těsně k jádru, od kterého je oddělena vícevrstvou membránou. Subakrozomová zóna je tvořená různě hustými elektronovými oblastmi s odlišným množstvím filament. (Obr. 36; 37).

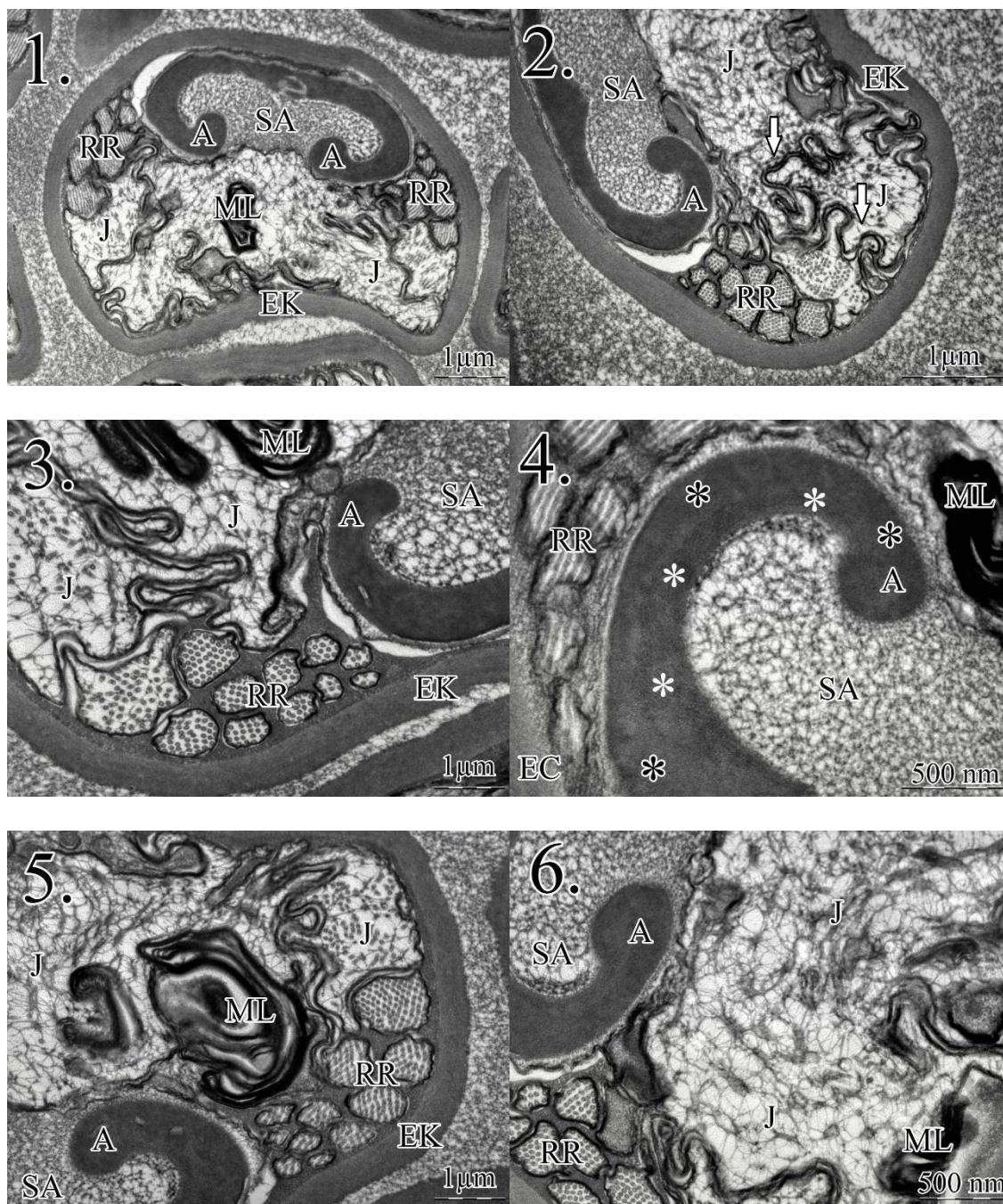
Radiální ramena jsou u obou raků přítomna jako soubor provazců vycházející z jádra a sestavený z mnoha mikrotubulů, které se obalují kolem hlavního těla akrozomu. Těchto ramen v daném souboru může být kolem akrozomu v extracelulární kapsli hned několik (Obr. 36(4); 37(4)).

Membránové lamely jsou náhodně lokalizované asymetrické struktury, které jsou v buňce velmi dobře viditelné. Vznikají změnou mitochondrií v průběhu spermatogeneze a jsou tvořené shluky a svazky spletutých membrán. Můžeme vidět, že oba druhy mají lamely velmi podobné (Obr. 36(5); 37(5)).

Jádro je umístěno v protilehlé části od akrozomu a zaujímá v buňce poměrně velkou oblast. Tato oblast je tvořená z velkého množství jaderným materiálem. Nacházejí se zde ovšem i shluky vláken a mikrotubulů, které vytvářejí až velké svazky (membránovní lamely). Od subakrozomu a ostatních struktur je jaderná oblast oddělaná jasnou dvojitou membránou (Obr. 36(6); 37(2,6)).



Obr. 36. Transmisní elektronové mikrofotografie spermií raka mexického *Cambarellus patzcuarensis*. **1.** Sagitální pohledy na spermii; **2.** Detailní pohled na sagitální řez buňky; **3.** Detail na radiální ramena; **4.** Elektronové vrstvy a filamenty v těle akrozomu **Tmavé ***: Zóna s filamenty (vysoká elektronová hustota; **Bílé ***: Zóna bez filament (malá elektronová hustota); **5.** Detailní pohled na membranózní lamelu; **6.** Detailní pohled na jádro a dvojitou membránu (znázorněno šipkami). **A:** akrozom; **ML:** membranózní lamely (membranous lamella); **RR:** radiální ramena; **J:** jádro; **SA:** subakrozom; **EK:** extracelulární kapsle (Foto: Autor).



Obr. 37. Transmisní elektronové mikrofotografie spermií raka brazoského *Cambarellus texanus*. **1.** Sagitální pohledy na spermiích; **2.** Detailní pohled na sagitální řez buňky a dvojitou membránu jádra (znázorněno šipkami); **3.** Detail na radiální ramena; **4.** Elektronové vrstvy a filameny v těle akrozomu **Tmavé ***: Zóna s filameny (vysoká elektronová hustota); **Bílé ***: Zóna bez filament (malá elektronová hustota); **5.** Detailní pohled na membranózní lamelu; **6.** Detailní pohled na jádro. **A:** akrozom; **ML:** membranózní lamely (membranous lamella); **RR:** radiální ramena; **J:** jádro; **SA:** subakrozom; **EK:** extracelulární kapsle (Foto: Autor).

4.2. Biometrie spermie raka mexického a raka brazoského

Biometrie akrozomu: Spermie raka mexického měly širší akrozom, než tomu bylo u raka brazoského ($4,015 \pm 0,2 \mu\text{m}$ vs. $2,930 \pm 0,3 \mu\text{m}$). Tento rozdíl by statisticky průkazný ($p < 0.01$). Stejně tomu bylo v případě délky akrozomu, která byla u raka mexického ($1,655 \pm 0,1 \mu\text{m}$) větší, než u raka brazoského ($1,209 \pm 0,1 \mu\text{m}$; $p < 10^{-6}$). Tvar akrozomů (poměr délky a šířky) však byl u obou druhů (rak mexický $0,412 \pm 0,03$; rak brazoského $0,413 \pm 0,04$) identický ($p = 0.567$). Při porovnání se širší skupinou již dříve studovaných račích druhů jsou však tyto akrozomy rozměrově i tvarově prakticky identické (viz. diskuse níže).

5. Diskuse

Spermie sladkovodních desetinožců jsou se svou morfologií velmi různorodé, což z nich činí vhodné kandidáty pro fylogenetické studie (Jamieson 1991; Jamieson a kol., 2000; Tudge 2009; Klaus a kol., 2011; Braga a kol., 2013). Spermie u desetinožců jsou strukturálně velmi odlišné ve srovnání se spermii jiných skupin zvířat. Například oproti savcům nemají bičíky a jsou tak nepohyblivé. Spermie desetinožců jsou ultrastrukturálně složeny z hlavního tělesa (buňky), které obsahuje akrozomální a jadernou oblast (Felgenhauer a kol., 1991; Jamieson, 1991; Jamieson a kol., 2000; Tudge, 2009). Akrozom je přítomen u všech dosud studovaných desetinožců, s výjimkou některých krevet podřádu dendrobranchiata (Aristeidae a Sergestidae) a krevet rodu *Stenopus* z čeledi Stenopodidae. Některé ze zkoumaných rodů z řádu Euphausiacea vykazovala také spermie bez akrozomů (Scelzo a kol., 2004; Medina a kol., 2006; Tudge, 2009). Spermie desetinožích korýšů jsou obecně hrubě rozděleny na dva typy: multistelátní a unistelátní (Medina 1994). Unistelátní spermie, typické pro podřád Dendrobranchiata a Caridea, vykazují jediný přívěsek nebo hrot, který je rozšířením akrozomální struktury (akrozomu). Naopak, multistelátní spermie nesoucí druhy podřádu Pleocyemata vykazují několik přívěsků nebo ramen jaderného nebo cytoplazmatického původu (radiální ramena), které obsahují chromatin nebo mikrotubuly. Multistelátní spermie jsou typické pro desetinožé korýše, jako jsou kraby, humři nebo raci (Felgenhauer a kol., 1991; Jamieson, 1991; Medina a kol., 1992; Medina 1994; Jamieson a kol., 2000; Cuartas a kol., 2007; Tudge, 2009). Spermie raků se liší ve své organizaci od výše popsané akrozomem ve tvaru podkovy, který není dvojvrstvý. Počet radiálních

ramen je větší (u některých druhů až 20 nebo i více). Buněčná membrána této gamety je mnohem silnější než u většina spermií desetinožců a je označována jako extracelulární kapsle (Felgenhauer, 1992).

Morfologické znaky: Výsledky této studie vykazují blízkou podobnost raka mexického a brazoského s obecnou ultrastrukturou spermií s doposud studovanými raky. Nejširší podobnosti v ultrastruktuře můžeme pozorovat s čeledí Cambaridae, pod kterou trpasličí raci podčeledi Cambarellinae spadají. U této čeledi se ultrastruktura trpasličích raků shoduje zejména v přítomnosti radiálních ramen a extracelulární kapsle. Malé výjimky tvoří zejména rak červený, u kterého je ve stádiu zralé spermie lokalizovaný hrot v přední části akrozomu, nebo některé druhy rodu *Faxonius* a *Cambarus*, u kterých je přítomen tzv. hřeben viz. Tab. 3. Další rozdíly v rámci čeledi můžeme sledovat i ve velikosti samotného akrozomu, nicméně velikostně se mírně odlišují pouze rody *Faxonius* a *Cambarus*, u ostatních rodů je velikost akrozomů podobná.

U dalších čeledí pomocí kombinace morfologických rysů, jako je apikální zóna, hrot, radiální ramena, hřeben v přední části akrozomu nebo extracelulární kapsle mohou poskytnout nástroj k rozlišení různých druhů sladkovodních raků a jednotlivých čeledí. Přítomnost či absence hlavních morfologických rysů několika vybraných druhů ze čtyř čeledí sladkovodních raků doplněná o raky studované touto prací jsou shrnuty v Tab. 3.

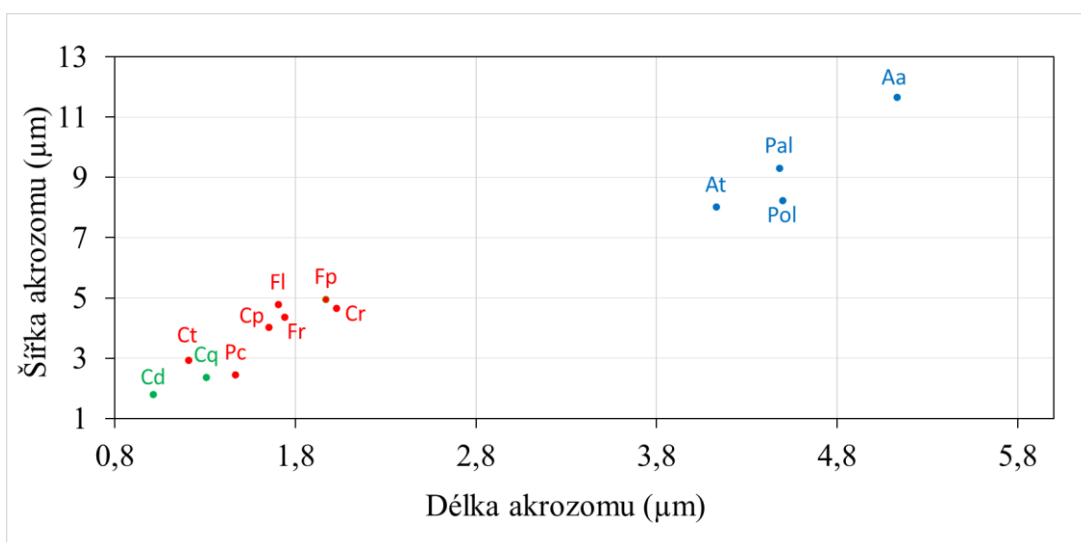
Tab. 3. Shrnutí morfologických znaků u 15 druhů sladkovodních raků, doplněné o zde studované raka mexického *Cambarellus patzcuarensis* a raka brazoského *Cambarellus texanus*. **Hrot:** hrot u akrozomu; **AZ:** apikální zóna; **H:** hřeben (v přední části akrozomu); **EK:** extracelulární kapsle; **RR:** radiální ramena; +: přítomnost; -: absence. Převzato z Yazicioglu a kol., (2016) a upraveno autorem.

Druh	Hrot	AZ	H	EK	RR
<i>Astacus astacus</i>	–	+	–	+	+
<i>Pontastacus leptodactylus</i>	–	+	–	+	+
<i>Austropotamobius torrentium</i>	–	+	–	+	+
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	–	+	–	+	+
<i>Cambarus robustus</i>	–	–	+	+	+
<i>Faxonius limosus</i>	–	–	+	+	+
<i>Faxonius propinquus</i>	–	–	+	+	+
<i>Faxonius rusticus</i>	–	–	+	+	+
<i>Procambarus alleni</i>	+	–	–	+	+
<i>Procambarus clarkii</i>	+	–	–	+	+
<i>Cambarellus patzcuarensis</i>	–	–	–	+	+
<i>Cambarellus texanus</i>	–	–	–	+	+
<i>Cherax destructor</i>	–	–	–	–	–
<i>Cherax quadricarinatus</i>	–	–	–	–	–
<i>Cambaroides japonicus</i>	+	–	–	+	+

Od ostatních čeledí se skupina trpasličích raků odlišuje širším rozmezím znaků. Největší rozdíly v ultrastruktuře trpasličích raků, ale i u dalších čeledí, jsou pozorovatelné vůči čeledi Parastacidae. Tato čeleď je charakteristická významnými odlišnostmi oproti zbylým třem čeledím z nadčeledi Astacoidea, u kterých je podobnost podstatně bližší. Oproti ostatním čeledím se Parastacidae odlišují absencí extracelulární kapsle a absencí radiálních ramen. Akrozom je u této čeledi dělený pouze na dvě vrstvy různé elektronové hustoty filament oproti zbylým rakům, kteří mají vrstvy tři (Yasuzumi a kol., 1961; Niksirat a kol., 2013a, b; Kouba a kol., 2015). Další odlišností u této čeledi je i přítomnost tzv. membránového lamelárního komplexu, což je komplex zahrnující jednu a více membránových lamel (Kouba a kol., 2015).

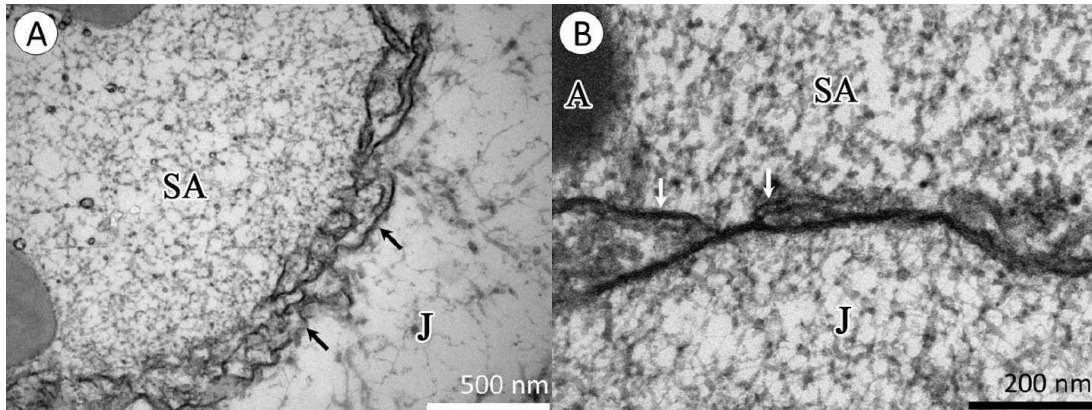
Čeď Astacidae se oproti trpasličí skupině, ale i ostatním čeďm, liší v přítomnosti apikální zóny nacházející se v přední části akrozomu, která je blíže popásána v podkapitole 2.2.2. Spermie.

Akrozomální komplex je obecně rozdělený na dvě hlavní části: akrozom a subakrozom, jak můžeme pozorovat u všech račích čeďí včetně skupiny trpasličích raků. Rozdíly můžeme nalézt pouze ve tvaru a velikosti samotného akrozomu. Tyto rozdíly v rozměrech akrozomů můžeme pozorovat v Grafu 2.



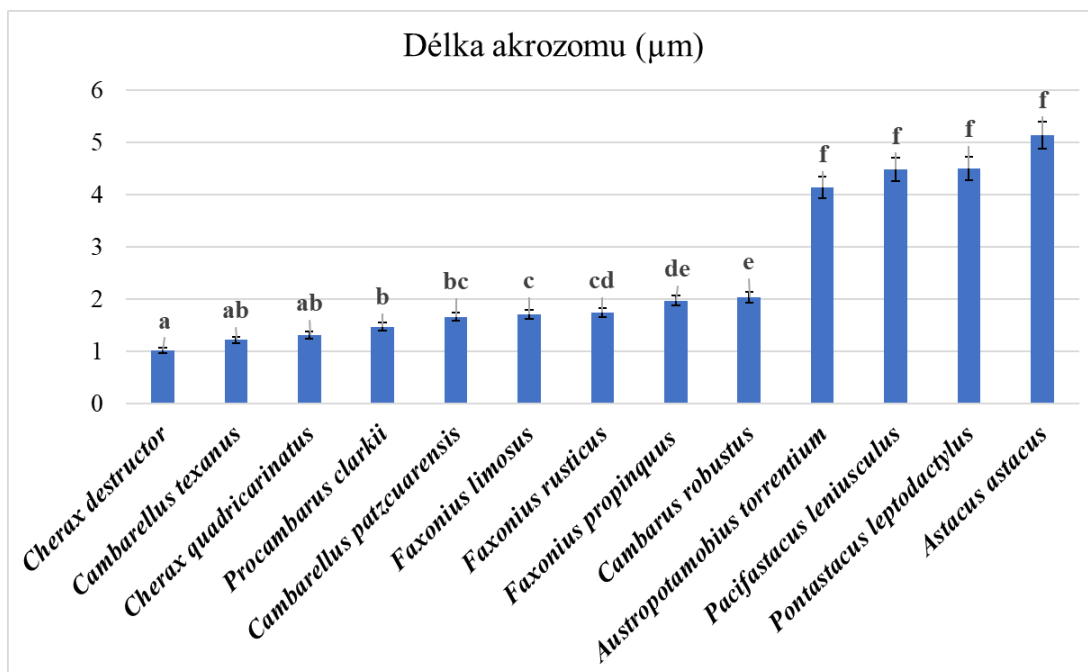
Graf 2. Velikosti akrozomu spermií 13 vybraných druhů raků: **Astacidae** (značeno tmavě modře) – *Astacus astacus* (**Aa**; Niksirat a kol., 2013b; Niksirat a kol., 2016), *Austropotamobius torrentium* (**At**; Niksirat a kol., 2013b) *Pacifastacus leniusculus* (**Pal**; Niksirat a kol., 2013b; Yazicioglu a kol., 2014), *Pontastacus leptodactylus* (**Pol**; Eliakova a kol., 1966; Niksirat a kol., 2013a); **Cambaridae** (značeno tmavě červeně) – *Cambarus robustus* (**Cr**; Yazicioglu a kol., 2016), *Faxonius limosus* (**Fl**; Niksirat a kol., 2013a), *F. propinquus* (**Fp**; Yazicioglu a kol., 2016), *F. rusticus* (**Fr**; Snedden 1990; Yazicioglu a kol., 2016), *Procambarus clarkii* (**Pc**; Niksirat a kol., 2013a; Dong a kol., 2014); *Cambarellus patzcuarensis* (**Cp**; vlastní pozorování); *Cambarellus texanus* (**Ct**; vlastní pozorování); **Parastacidae** (značeno tmavě zeleně) – *Cherax destructor* (**Cd**; Jerry 2001; Kouba a kol., 2015), *C. quadricarinatus* (**Cq**; López-Greco a kol., 2008; Kouba a kol., 2015).

Jádro je u všech spermií jednotlivých čeledí lokalizované stejně. Tato oblast je přítomná v protilehlé poloze od akrozomu. Jaderná oblast je od akrozomální komplexu oddělena zřetelnou dvojitou membránou (Obr. 38.).

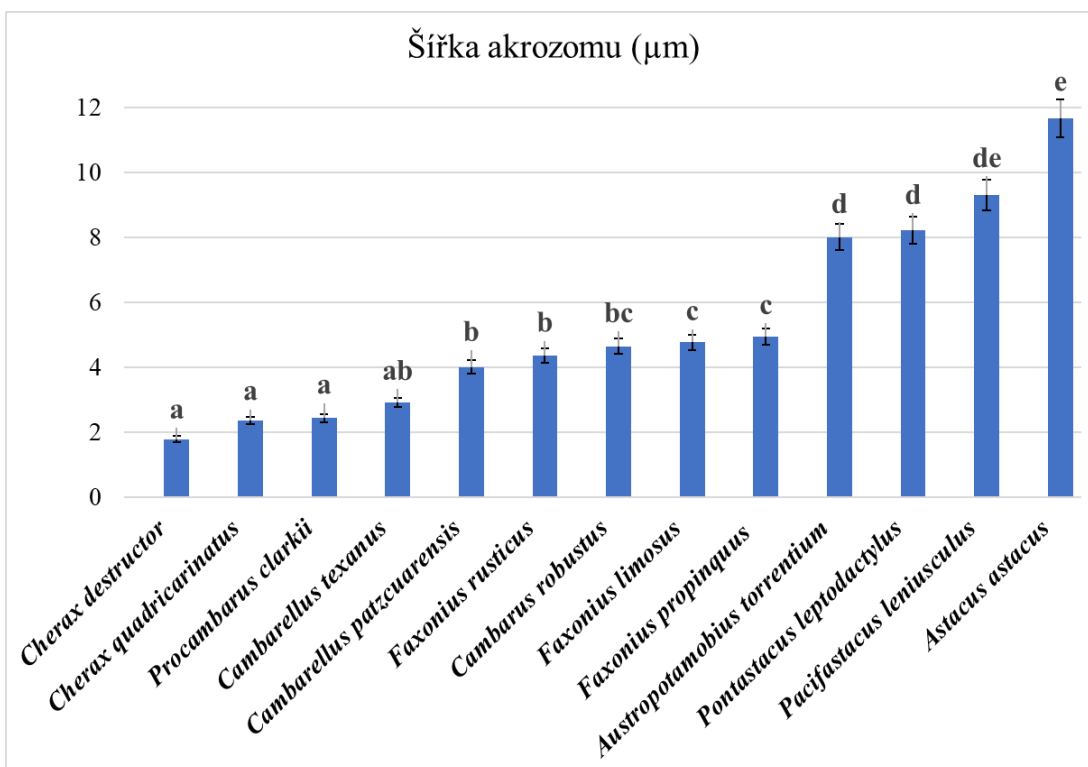


Obr. 38. Detail na membránu mezi subakrozomem a jádrem raka červenoklepetého *Cherax quadricarinatus*. (A): vícevrstevná membrána mezi subakrozomem a jádrem (šípky); (B): detail membrány (šípky). A: akrozom; J: jádro; SA: subakrozom. Převzato z Kouba a kol., (2015) a upraveno autorem.

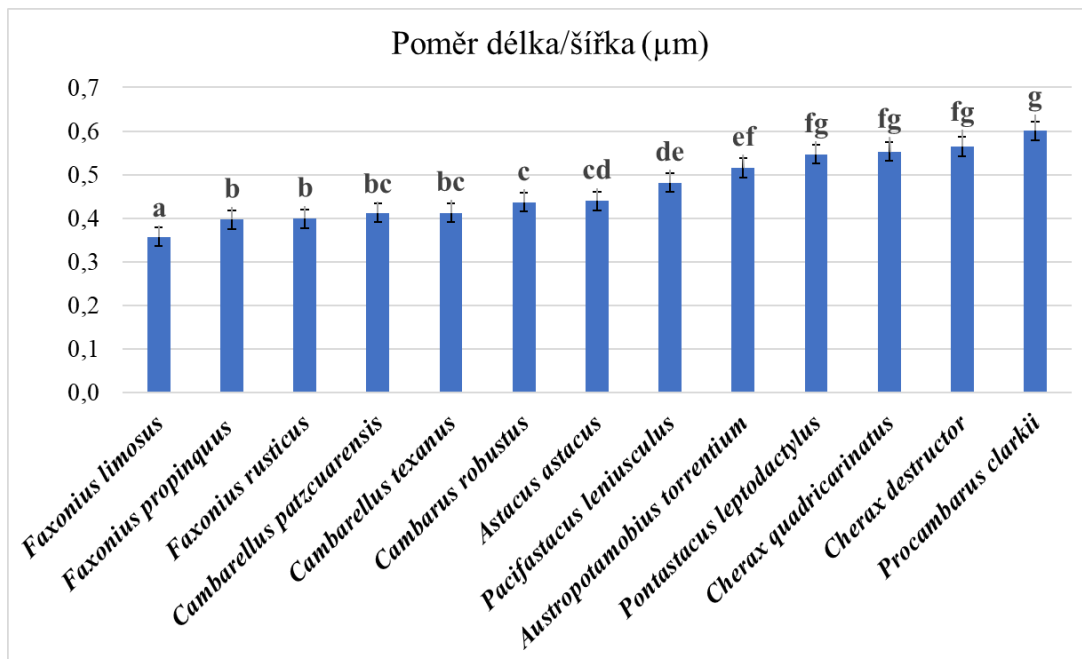
Biometrie akrozomu: Výpočet rozměrů akrozomů raků studovaných touto prací byl jedním ze sledovaných cílů. Doposud získané informace nám říkají, že i přes určité a významné podobnosti může být pro rozlišení jednotlivých račích skupin užitečná i kombinace různých rozměrů akrozomu (délka, šířka a poměr délka/šířka). Pro snazší orientaci jsou níže znázorněny tři grafy pojednávající o průměrné délce a šířce akrozomu a i graf ukazující poměr mezi těmito dvěma rozměry (Graf. 3-5.). Výsledky ukazují, že zde studované raci zaujímají rozměry na spodní hranici čeledi Cambaridae a *Cambarellus texanus* má blíže k čeledi Parastacidae. Celkově tedy můžeme říct, že akrozomy spermií trpasličích raků jsou menší, ale ne tak významně, abychom mohli tvrdit, že došlo k jasné velikostní segregaci od již studovaných zástupců této čeledi. V grafu 5. můžeme pozorovat výsledky poměru délka/šířka. U všech druhů je hodnota nižší než jedna, což odpovídá tvaru stlačeného akrozomu do tvaru „koblíhy“. Hodnoty pozorované u zde studovaných raků naznačují, že tvar jejich akrozomu se řadí mezi druhy s nejvíce stlačeným akrozomem.



Graf 3. Délka akrozomu spermií 13 vybraných druhů raků. Převzato z Yazicioglu a kol., (2016) a doplněno autorem.



Graf 4. Šířka akrozomu spermií 13 vybraných druhů raků. Převzato z Yazicioglu a kol., (2016) a doplněno autorem.



Graf 5. Poměr délky a šířky akrozomu spermií 13 vybraných druhů raků. Převzato z Yazicioglu a kol., (2016) a doplněno autorem.

6. Závěr

Cílem této práce bylo získat informace o ultrastruktuře spermií dvou druhů trpasličích raků, konkrétně raka mexického a raka brazoského a zjistit rozměry akrozomů jejich spermií. Z výsledků mé práce lze vyčíst, že obecná ultrastruktura račích spermií studovaných druhů nese vysokou podobnost u nadčeledí Astacoidea a především jim vlastní čeledi Cambaridae. Přes dobře zachovanou obecnou strukturu a poměrně blízkou podobnost ultrastruktury spermií různých druhů raků mohou být pro oddělení jednotlivých skupin raků užitečné také rozměry akrozomů. Akrozomy studovaných druhů patří podle pozorovaných výsledků k nejmenším akrozomům své čeledi. Výsledky mé práce tak mohou být možným podkladem pro další studie ať už trpasličích raků nebo dalších druhů račí fauny.

7. Přehled použité literatury

- An C. G., Weng X. L., Xu Y. Z., Fan Y. J., Zhao Y. L., 2011. Histological and ultrastructural studies on the male reproductive system and spermatogenesis in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Crustacean Biology*, 31(2): 223–230. DOI: [10.1651/10-3342.1](https://doi.org/10.1651/10-3342.1)
- Anderson W. A., Ellis R. A., 1967. Cytodifferentiation of the crayfish spermatozoon: acrosome formation, transformation of mitochondria and development of microtubules. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 77(1): 80–94. DOI: [10.1007/BF00336700](https://doi.org/10.1007/BF00336700)
- Andrews E.A. 1906. The annulus ventralis. *Proceedings of the Boston Society of Natural History*, 32: 427–479.
- Austin C. M., 1998. A comparison of the clutch and brood size in the red-Claw, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) and the yabby, *C. destructor* (Clark) (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture*, 167: 135–145.
- Braga A., Nakayama C. L., Poersch L., Wasielesky W., 2013. Unistellate spermatozoa of decapods: comparative evaluation and evolution of the morphology. *Zoomorphology*, 132(3): 261–284. DOI: [10.1007/s00435-013-0187-2](https://doi.org/10.1007/s00435-013-0187-2)
- Beach D., Talbot P., 1987. Ultrastructural comparison of sperm from the crayfishes *Cherax tenuimanus* and *Cherax albidus*. *Journal of Crustacean Biology*, 7(2): 205–218. DOI: [10.2307/1548602](https://doi.org/10.2307/1548602)
- Beatty S. J., Morgan D. L., Gill H. S., 2003. Reproductive biology of the large freshwater crayfish *Cherax cainii* in south-western Australia. *Marine and Freshwater Research*, 54(5): 597–608. DOI: [10.1071/MF02077](https://doi.org/10.1071/MF02077)
- Berrill M., Arsenault M., 1982. Spring breeding of a northern temperate crayfish, *Orconectes rusticus*. *Canadian Journal of Zoology*, 60(11): 2641–2645. DOI: [10.1139/z82-339](https://doi.org/10.1139/z82-339)
- Borisov R., Tertitskaya A., 2010. The Process of Caudal Fan Formation in Freshwater Crayfish. *Freshwater Crayfish*, 17, 235–238.
- Brown G.G., 1966. Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm–egg interaction in the decapod *Callinectes sapidus*. *Journal of Ultrastructure Research*, 14: 425–440. DOI: [10.1016/S0022-5320\(66\)80073-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(66)80073-4)
- Burton T., Knott B., Judge D., Vercoe P., Brearley A., 2007. Embryonic and juvenile attachment structures in *Cherax cainii* (Decapoda: Parastacidae): Implications for maternal care. *The American midland naturalist*, 157(1): 127–136. DOI: [10.1674/0003-0031\(2007\)157\[127:EJASIJ\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2007)157[127:EJASIJ]2.0.CO;2)
- Buřič M., Kouba A., Kozák P., 2010a. Intra-sex dimorphism in crayfish females. *Zoology*, 113(5): 301–307. DOI: [10.1016/j.zool.2010.06.001](https://doi.org/10.1016/j.zool.2010.06.001)
- Buřič M., Kouba A., Kozák P., 2010b. Molting and growth in relation to form alternations in the male spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus*. *Zoological Studies*, 49(1): 28–38.
- Buřič M., Kouba A., Kozák P., 2013. Reproductive plasticity in freshwater invader: from long-term sperm storage to parthenogenesis. *PloS ONE*, 8(10): e77597. DOI: [10.1371/journal.pone.0077597](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077597)

- Buřič M., Haubrock P. J., Veselý L., Kozak P., Kouba A., 2021. Effective investments due to seasonal morphological changes? Possible reasons and consequences of allometric growth and reproduction in adult signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). Canadian Journal of Zoology, 99(2): 85–96. DOI: [10.1139/cjz-2020-0155](https://doi.org/10.1139/cjz-2020-0155)
- Brewis J.M., Bowler K., 1985. A study of reproductive females of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* Hydrobiologia 121: 145 – 149. Briede, I., 2011. Crayfish in Latvia. Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis, 11: 83–87.
- Carral J. M., Celada J. D., González J., Sáez-Royuela M., Gaudioso V. R., 1994. Mating and spawning of freshwater crayfish, *Austropotamobius pallipes* Lereboullet, under laboratory conditions. Aquaculture Research, 25(7): 721–727. DOI: [10.1111/j.1365-2109.1994.tb00736.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1994.tb00736.x)
- Cuartas E. I., Sousa L. G., 2007. Ultrastructural study of the spermatophores and spermatozoa in *Uca uruguayensis* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). Biociências, 15(1): 21–28.
- Cukerzis J. M., Sheshtokas J., Terentyev A. L., 1978. Method for accelerated artificial breeding of crayfish juveniles. Freshwater Crayfish, 4(45): 1–458.
- Department of Energy and Environmental Protection. CT.GOV-Connecticut's Official State Website [online]. Copyright © [citováno dne 24.01.2021]. Webová stránka dostupná z: <https://ctdeep.maps.arcgis.com/apps/MapJournal/index.html?appid=b9b8fa8441ac4ccab088db6c38ff0500#>
- Dong W. L., Hou C. C., Yang W. X., 2015. Mitochondrial prohibitin and its ubiquitination during crayfish *Procambarus clarkii* spermiogenesis. Cell and tissue research, 359(2): 679–692. DOI: [10.1007/s00441-014-2044-0](https://doi.org/10.1007/s00441-014-2044-0)
- Dubé P., Portelance B., 1992. Temperature and photoperiod effects on ovarian maturation and egg laying of the crayfish, *Orconectes limosus*. Aquaculture, 102(1–2): 161–168. DOI: [10.1016/0044-8486\(92\)90298-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90298-Y)
- Dudenhause E. E., Talbot P., 1979. Spermiogenesis in the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Journal of Cell Biology, 83, 225a.
- Dudenhause E. E., Talbot P., 1982. An ultrastructural analysis of mature sperm from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, Dana. International Journal of Invertebrate Reproduction, 5(3): 149–159. DOI: [10.1080/01651269.1982.10553464](https://doi.org/10.1080/01651269.1982.10553464)
- Dudenhause E. E., Talbot P., 1983. An ultrastructural comparison of soft and hardened spermatophores from the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana. Canadian Journal of Zoology, 61(1): 182–194. DOI: [10.1139/z83-023](https://doi.org/10.1139/z83-023)
- Eliakova G., Goriachkina V., 1966. Some features of the crayfish spermatocyte ultrastructure. In International congress for electron microscopy, Kyoto, Japan; August 28th–September 4th.
- Felgenhauer B. E., Abele L. G., 1991. EIGHTEEN. Morphological Diversity of Decapod Spermatozoa. In Crustacean Sexual Biology, (pp. 322–342). Columbia University Press. DOI: [10.7312/baue90796-019](https://doi.org/10.7312/baue90796-019)
- Felgenhauer B. E., 1992. Internal anatomy of the Decapoda: an overview. Microscopic Anatomy of Invertebrates, 10: 45–75.

- Grandjean F., Cornuault B., Archambault S., Bramard M., Otrebsky G., 2000. Life history and population biology of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*, in a brook from the Poitou-Charentes region (France). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (356): 55–70. DOI: [10.1051/kmae:2000004](https://doi.org/10.1051/kmae:2000004)
- Guiasu R.C., 2002. *Cambarus*. In: Holdich, D.M. (Ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Scientific, Oxford, 609–634.
- Hamr P., 1990. Comparative reproductive biology of the Tasmanian freshwater crayfishes *Astacopsis gouldi* Clark, *Astacopsis franklinii*, Gray and *Parastacoides tasmanicus* Clark (Decapoda: parastacidae) (Doctoral dissertation, University of Tasmania).
- Hamr P., 2002. *Biology of freshwater crayfish*. In: Holdich D. (ed.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- Hobbs H.H. Jr., Hobbs III, H. H., Daniel, M. A., 1977. A review of the troglobitic decapod crustaceans of the Americas. *Smithsonian Contributions to Zoology*, pp. 75–141.
- Holdich D. M., Reeve I. D., 1988. Functional morphology and anatomy. In: Holdich, D. M., Lowery R. S., (Eds), *Freshwater crayfish – Biology, Management and Exploitation*. London: Croom Helm, Portland: Timber press, 11–51.
- Holdich D.M., Haffer P., Noël P., Carral J., Füreder L., Gherardi F., Machino Y., Madec J., Pöckl M., Smietana P., Taugbol T., Vigneux E., 2006. Species files. In: Souty-Grosset, C., Hholdich D.M., Noel, P.Y., Reynolds, J.D., Haffner, P. (Eds) *Atlas of Crayfish in Europe*. Muséum national d’Histoire naturelle, Paris, pp. 49–130.
- Hobbs H.H. Jr., Horton H., 1989. An Illustrated Checklist of the American Crayfishes (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, no. 480. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, USA, iii + 236.
- Hobbs III H.H., 2001. Decapoda. IN: Thorp J.H., Covich A.P., (EDS.), *Ecology and classification of north american freshwater invertebrates*, 2nd Ed. Academic press, LONDON 955–1001.
- Horwitz P., 1988. Secondary sexual characteristics of females of the freshwater crayfish genus *Engaeus* (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana*, 54(1): 25–32. DOI: [10.1163/156854088X00591](https://doi.org/10.1163/156854088X00591)
- Huber M. G. J., Schubart C. D., 2005. Distribution and reproductive biology of *Austropotamobius torrentium* in Bavaria and documentation of a contact zone with the alien crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, (376-377): 759–776. DOI: [10.1051/kmae:2005031](https://doi.org/10.1051/kmae:2005031)
- Charniaux-Cotton H., 1975. Hermaphroditism and Gynandromorphism in Malacostracan Crustacea. In: Reinboth R. (ed.), *Intersexuality in the Animal Kingdom*. Springer, Berlin, Heidelberg, 91–105. DOI: [10.1007/978-3-642-66069-6_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-66069-6_11)
- Cherkashina N. Y., 1999. *Caspiastacus pachypus* (Rathke, 1837), its biology and distribution. *Freshwater Crayfish*, 12: 846–853.
- Jamieson B. G. M., 1991. Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. *Memoirs of the Queensland Museum*, 31: 109–142. DOI: [10.1016/S0044-8486\(01\)00511-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00511-7)
- Jamieson B. G. M., Tudge C. C., 2000. Crustacea-Decapoda. In: Adiyodi KG, Adiyodi RG, Jamieson BGM (eds) *Reproductive biology of invertebrates. Progress in male gamete ultrastructure and phylogeny*, vol 9C. Wiley, Chichester, pp 1–95

- Jerry D. R., 2001. Electrical stimulation of spermatophore extrusion in the freshwater yabby (*Cherax destructor*). *Aquaculture*, 200(3–4): 317–322. DOI: [10.1016/S0044-8486\(01\)00511-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00511-7)
- Jones C. M., 1995. Production of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens)(Decapoda, Parastacidae) I. Development of hatchery and nursery procedures. *Aquaculture*, 138(1–4): 221–238.
- Kawai T., Scholtz G., 2002. Behavior of juveniles of the Japanese endemic species *Cambaroides japonicus* (Decapoda: Astacidea: Cambaridae), with observations on the position of the spermatophore attachment on adult females. *Journal of Crustacean Biology*, 22(3): 532–537. DOI: [10.1163/20021975-99990264](https://doi.org/10.1163/20021975-99990264)
- Kawai T., Hamano T., Matsuura S., 1994. Molting season and reproductive cycle of the Japanese crayfish, *Cambaroides japonicus* in a stream and a small lake in Hokkaido. *Suisan Zoshoku*, 42 : 465 – 470. DOI: [10.11233/aquaculturesci1953.42.465](https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.42.465)
- Kirjavainen J., Westman K., 1999. Natural history and development of the introduced signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in a small, isolated Finnish lake, from 1968 to 1993. *Aquatic Living Resources*, 12(6): 387–401. DOI: [10.1016/S0990-7440\(99\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)00110-2)
- King C., 1993. Potential fecundity of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* von Martens, in culture. *Aquaculture*, 114(3–4), 237–241. DOI: [10.1016/0044-8486\(93\)90299-E](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90299-E)
- Klaus S., Brandis D., 2011. Evolution of sperm morphology in potamid freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Potamoidea). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 161(1): 53–63. DOI: [10.1111/j.1096-3642.2009.00625.x](https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2009.00625.x)
- Kouba A., Niksirat H., Bláha M., Hamr P., 2014. Spermatozoon ultrastructure in big water crayfish *Cambarus robustus* and Florida crayfish *Procambarus alleni* with focus on presence of acrosomal spike. In: 20th Symposium of International Association of Astacology (IAA 20), 22–26 September 2014, Sapporo, Japan, p. 92.
- Kouba A., Niksirat H., Bláha M., 2015. Comparative ultrastructure of spermatozoa of the redclaw *Cherax quadricarinatus* and the yabby *Cherax destructor* (Decapoda, Parastacidae). *Micron*, 69: 56–61. DOI: [10.1016/j.micron.2014.11.002](https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.11.002)
- Kovačeva N., 1998. Reprodukce raka bahenního (*Astacus leptodactylus* Esch.) v řízených podmínkách v Bulharsku. *Bulletin VÚRH JU Vodňany*, 30(3): 103–108.
- Kozák P., Ďuriš Z., Petrušek A., Buřič M., Horká I., Kouba A., Kozubíková-Balcarová E., Polícar T., 2015. Biologie a chov raků. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, 20–21.
- Kubec J., 2012. Elektrostimulace spermiace u raků. České Budějovice. Bakalářská práce (Bc.). Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. Fakulta rybářství a ochrany vod.
- Lampert K. P., 2008. Facultative parthenogenesis in vertebrates: reproductive error or chance? *Sexual Development*, 2(6): 290–301. DOI: [10.1159/000195678](https://doi.org/10.1159/000195678)
- Lawrence C., 2002. Margaret River Marron: morphology and hybrids. In *Scientific Workshop on the Margaret River Marron*, Perth, Australie, (Vol. 2023).
- Lewis S. D., 2002. *Pacifastacus*. *Biology of freshwater crayfish*, 511–540.

- López-Camps J., Bargalló R., Bozzo M. G., Durfort M., Fontarnau R., 1981. The spermatogenesis of crustaceans. VII. Review of spermatozoon of the crayfish *Astacus astacus* (Malacostraca, Decapoda, Macrura, Reptantia). *Gamete Research*, 4(1): 65–82. DOI: [10.1002/mrd.1120040110](https://doi.org/10.1002/mrd.1120040110)
- López Greco L. S., Lo Nostro F. L., 2008. Structural changes in the spermatophore of the freshwater ‘red claw’ crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898)(Decapoda, Parastacidae). *Acta Zoologica*, 89(2): 149–155. DOI: [10.1111/j.1463-6395.2007.00303.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2007.00303.x)
- López Greco L. S., Vazquez F., Rodríguez E. M., 2007. Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater ‘red claw’ crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898)(Decapoda, Parastacidae). *Acta Zoologica*, 88(3): 223–229. DOI: [10.1111/j.1463-6395.2007.00269.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2007.00269.x)
- Martin J. W., Crandall K. A., Felder D. L., 2016. Decapod crustacean phylogenetics. CRC press.
- McClain W. R., Romaine R. P., 2007. Procambriid crawfish: life history and biology. Southern Regional Aquaculture Center, 2403.
- Medina A., Rodríguez A., 1992. Spermiogenesis and sperm structure in the crab *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), with special reference to the acrosome differentiation. *Zoomorphology*, 111(3): 161–165. DOI: [10.1007/BF01632905](https://doi.org/10.1007/BF01632905)
- Medina A., 1994. Spermiogenesis and sperm structure in the shrimp *Parapenaeus longirostris* (Crustacea: Dendrobranchiata): comparative aspects among decapods. *Marine Biology*, 119(3): 449–460. DOI: [10.1007/BF00347542](https://doi.org/10.1007/BF00347542)
- Medina A., García-Isarch E., Sobrino I., Abascal F. J., 2006. Ultrastructure of the spermatozoa of *Aristaeopsis edwardsiana* and *Aristeus varidens* (Crustacea, Dendrobranchiata, Aristeidae). *Zoomorphology*, 125(1): 39–46. DOI: [10.1007/s00435-005-0013-6](https://doi.org/10.1007/s00435-005-0013-6)
- Medley P. B., Rouse D. B., 1993. Intersex Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Journal of Shellfish Research*, 12(1): 93–94.
- Mogie M., 1986. Automixis: its distribution and status. *Biological Journal of the Linnean Society*, 28(3): 321–329. DOI: [10.1111/j.1095-8312.1986.tb01761.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1986.tb01761.x)
- Moses MJ., 1961a. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*) I. Structural characterization of the mature sperm. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 9:222–228.
- Moses MJ., 1961b. Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*). II. Description of stages. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 10:301–333.
- Nakata K., Goshima S., 2004. Fecundity of the Japanese crayfish, *Cambaroides japonicus*: ovary formation, egg number and egg size. *Aquaculture*, 242(1-4): 335–343. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2004.08.043](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.043)
- Niksirat H., Kouba A., Pšenička M., Kuklina I., Kozák P., 2013a. Ultrastructure of spermatozoa from three genera of crayfish Orconectes, Procambarus and Astacus (Decapoda: Astacoidea): New findings and comparisons. *Zoologischer Anzeiger—A Journal of Comparative Zoology*, 252(2): 226–233. DOI: [10.1016/j.jcz.2012.06.002](https://doi.org/10.1016/j.jcz.2012.06.002)
- Niksirat H., Kouba A., Rodina M., Kozak P., 2013b. Comparative ultrastructure of the spermatozoa of three crayfish species: *Austropotamobius torrentium*, *Pacifastacus leniusculus*, and *Astacus astacus* (Decapoda: Astacidae). *Journal of Morphology*, 274(7): 750–758. DOI: [10.1002/jmor.20132](https://doi.org/10.1002/jmor.20132)

- Niksirat H., Kouba A., Kozák P., 2014. Post-mating morphological changes in the spermatozoon and spermatophore wall of the crayfish *Astacus leptodactylus*: insight into a non-motile spermatozoon. *Animal Reproduction Science*, 149(3–4): 325–334. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2014.07.017](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.017)
- Niksirat H., Kouba A., Kozák P., 2015. Ultrastructure of egg activation and cortical reaction in the noble crayfish *Astacus astacus*. *Micron*, 68: 115–121. DOI: [10.1016/j.micron.2014.09.010](https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.09.010)
- Niksirat H., Kouba A., 2016. Subcellular localization of calcium deposits in the noble crayfish *Astacus astacus* spermatophore: Implications for post-mating spermatophore hardening and spermatozoon maturation. *Journal of Morphology*, 277(4): 445–452. DOI: [10.1002/jmor.20509](https://doi.org/10.1002/jmor.20509)
- Noro C., Buckup L., Bond-Buckup G., 2005. The juvenile stages of *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869)(Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Journal of Natural History*, 39(21): 1851–1873. DOI: [10.1080/00222930400005724](https://doi.org/10.1080/00222930400005724)
- Noro C., López-Greco L.S., Buckup L., 2008. Gonad morphology and type of sexuality in *Parastacus defossus* Faxon 1898, a burrowing, intersexed crayfish from southern Brazil (Decapoda: Parastacidae). *Acta Zool-Stockholm*, 89(1): 59–67. DOI: [10.1111/j.1463-6395.2007.0294.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2007.0294.x)
- Oluoch A. O., 1990. Breeding biology of the Louisiana red swamp crayfish *Procambarus clarkii* Girard in Lake Naivasha, Kenya. *Hydrobiologia*, 208(1): 85–92. DOI: [10.1007/BF00008447](https://doi.org/10.1007/BF00008447)
- Payne J.F., 1997. Adaptive success within the cambarid life cycle. *Freshwater Crayfish*, 11: 1–12.
- Pochon-Masson J., 1968. L'Ultrastructure des spermatozoïdes vésiculaires chez les crustacés décapodes avant et au cours de leur dévagination expérimentale. II. Macroures. Discussion et conclusions' *Annales des Sciences Naturelles Zoologie Paris 12e serie*, 10:367–454.
- Poljaroen J., Vanichviriyakit R., Tinikul Y., Phoungpetchara I., Linthong V., Weerachatanukul W., Sobhon P., 2010. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 249(2): 81–94. DOI: [10.1016/j.jcz.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.jcz.2010.03.002)
- Pöckl M., 1999. Distribution of crayfish species in Austria with special reference to introduced species. *Freshwater Crayfish*, 12, 733–750.
- Reynolds J. D., 1998. Conservation management of the white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* Part 1. *Irish Wildlife Manuals*, 1, 1–33.
- Reynolds J. D., 2002. Growth and reproduction. In: Holdich, D. M, (ED.), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science Ltd., Oxford 151–191.
- Rodríguez-Serna M. 1999. Biología y sistemática de los Cambáridos del sudeste de México y su potencial aprovechamiento en la acuicultura. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, 101 p.
- Rudolph E. H., 1995. Partial protandric hermaphroditism in the burrowing crayfish *Parastacus nicoleti* (Philippi, 1882)(Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 15(4): 720–732. DOI: [10.1163/193724095X00127](https://doi.org/10.1163/193724095X00127)
- Rudolph E.H., 2002. New records of intersexuality in the freshwater crayfish *Samastacus spinifrons* (Decapoda, Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 22(2): 377–389. DOI: [10.1163/20021975-99990245](https://doi.org/10.1163/20021975-99990245)

- Rudolph E. H., Retamal F. A., Martínez A. W., 2007. Partial Protandric Hermaphroditism in the Burrowing Crayfish *Virilastacus rucapihuelensis* (Decapoda, Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 27(2): 229–241. DOI: [10.1651/S-2706.1](https://doi.org/10.1651/S-2706.1)
- Sagi A., Khalaila I., Barki A., Hulata G., Karplus I., 1996. Intersex red Claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens): Functional males with pre-Vitellogenic ovaries. *The Biological Bulletin*, 190(1): 16–23. DOI: [10.2307/1542672](https://doi.org/10.2307/1542672)
- Sagi A., Manor R., Segall C., Da Vis C., Khalaila I., 2002. On intersexuality in the crayfish *Cherax quadricarinatus*: an inducible sexual plasticity model. *Invertebrate reproduction and development*, 41(1–3): 27–33. DOI: [10.1080/07924259.2002.9652732](https://doi.org/10.1080/07924259.2002.9652732)
- Savolainen R., Westman K., Pursiainen M. J. F. C., 1997. Fecundity of Finnish noble crayfish, *Astacus astacus* L., and signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus*, in various natural habitats and in culture. *Freshwater Crayfish*, 11: 319–338.
- Scelzo M. A., Medina A., 2004. A dendrobranchiate, *Peisos petrunkevitchi* (Decapoda, Sergestidae), with reptant-like sperm: a spermiocladistic assessment. *Acta Zoologica*, 85(2): 81–89. DOI: [10.1111/j.0001-7272.2004.00160.x](https://doi.org/10.1111/j.0001-7272.2004.00160.x)
- Scudamore H.H. 1948. Factors influencing molting and the sexual cycles in the crayfish. *The Biological Bulletin*, 95(2): 229–237.
- Seitz R., Vilpoux K., Hopp U., Harzsch S., Maier G., 2005. Ontogeny of the Marmorokrebs (marbled crayfish): a parthenogenetic crayfish with unknown origin and phylogenetic position. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 303(5): 393–405. DOI: [10.1002/jez.a.143](https://doi.org/10.1002/jez.a.143)
- Semple G. P., Rouse D. B., McLain K. R., 1995. *Cherax destructor*, *C. tenuimanus* and *C. quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae): a comparative review of biological traits relating to aquaculture potential. *Freshwater Crayfish*, 8: 495–503.
- Scholtz G., Kawai T., 2002. Aspects of embryonic and postembryonic development of the Japanese freshwater crayfish *Cambaroides japonicus* (Crustacea, Decapoda) including a hypothesis on the evolution of maternal care in the Astacida. *Acta Zoologica*, 83(3): 203–212. DOI: [10.1046/j.1463-6395.2002.00113.x](https://doi.org/10.1046/j.1463-6395.2002.00113.x)
- Scholtz G., Braband A., Tolley L., Reimann A., Mittmann B., Lukhaup C., Steuerwald F., Vogt, G., 2003. Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature*, 421(6925): 806–806. DOI: [10.1038/421806a](https://doi.org/10.1038/421806a)
- Skurdal J., Taugbøl T., 2002. *Astacus*. In: Holdich D.M. (ed.), *Biology of freshwater crayfish*, Blackwell Science, Oxford, pp. 467–510.
- Snedden W. A., 1990. Determinants of male mating success in the temperate crayfish *Orconectes rusticus*: chela size and sperm competition. *Behaviour*, 115(1–2): 100–113. DOI: [10.1163/156853990X00301](https://doi.org/10.1163/156853990X00301)
- Stein R. A., 1976. Sexual dimorphism in crayfish chelae: functional significance linked to reproductive activities. *Canadian Journal of Zoology*, 54(2): 220–227. DOI: [10.1139/z76-024](https://doi.org/10.1139/z76-024)
- Stucki T. P., 2002. Differences in live history of native and introduced crayfish species in Switzerland. *Freshwater Crayfish*, 13: 463–476.

- Talbot P., Chanmanon P., 1980. Morphological features of the acrosome reaction of lobster (*Homarus*) sperm and the role of the reaction in generating forward sperm movement. *Journal of Ultrastructure Research*, 70(3): 287–297. DOI: [10.1016/S0022-5320\(80\)80012-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(80)80012-8)
- Taugbøl T., Skurdal J., Fjeld E., 1988. Maturity and fecundity of *Astacus astacus* females in Norway. *Freshwater Crayfish*, 7, 107–114.
- Taugbøl T., Skurdal J., 1990a. Effect of density on brood size in noble crayfish, *Astacus astacus* L., subjected to indoor rearing conditions. *Aquaculture Research*, 21(1): 17–23. DOI: [10.1111/j.1365-2109.1990.tb00378.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1990.tb00378.x)
- Taugbøl T., Skurdal J., 1990b. Reproduction, molting and mortality of female noble crayfish, *Astacus astacus* (L., 1758), from five Norwegian populations subjected to indoor culture conditions (Decapoda, Astacoidea). *Crustaceana*, 58(2): 113–123.
- Tudge C. C., Scheltinga D. M., Jamieson B. G., 2001. Spermatozoal morphology in the "symmetrical" hermit crab, *Pylocheles* (*Bathycheles*) sp. (Crustacea, Decapoda, Anomura, Paguroidea, Pylochelidae). *Zoosystema*, 23(1): 117–130.
- Tudge C. C. 2009. Spermatozoal Morphology and its Bearing on Decapod Phylogeny. In: Martin, J.W., Crandall, A., Felder, D.L. (Eds.), *Crustacean Issues: Decapod Crustacean Phylogenetics*. Francis and Taylor/CRC Press, Boca Raton, pp. 101–119.
- Vogt V., 2002. Functional anatomy. In: Holdich D.M. (ed.), *Biology of Freshwater Crayfish*, Blackwell Science, Oxford, 53–151.
- Vogt G., Tolley L., Scholtz G., 2004a. Life stages and reproductive components of the Marmorokrebs (marbled crayfish), the first parthenogenetic decapod crustacean. *Journal of Morphology*, 261(3): 286–311. DOI: [10.1002/jmor.10250](https://doi.org/10.1002/jmor.10250)
- Vogt G., Tolley L., 2004b. Brood care in freshwater crayfish and relationship with the offspring's sensory deficiencies. *Journal of Morphology*, 262(2): 566–582. DOI: [10.1002/jmor.10169](https://doi.org/10.1002/jmor.10169)
- Vogt G., 2008. The marbled crayfish: a new model organism for research on development, epigenetics and evolutionary biology. *Journal of Zoology*, 276(1): 1–13. DOI: [10.1111/j.1469-7998.2008.00473.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00473.x)
- Vogt G., 2010. Suitability of the clonal marbled crayfish for biogerontological research: a review and perspective, with remarks on some further crustaceans. *Biogerontology*, 11(6): 643–669. DOI: [10.1007/s10522-010-9291-6](https://doi.org/10.1007/s10522-010-9291-6)
- Watts P.C., Buley K.R., Sanderson S., Boardman W., Ciofi C., 2006. Parthenogenesis in Komodo dragons. Should males and females be kept together to avoid triggering virgin birth in these endangered reptiles? *Nature*, 444(7122): 1021–1022. DOI: [10.1038/4441021a](https://doi.org/10.1038/4441021a)
- Wetzel J. E., 2002. Form alternation of adult female crayfishes of the genus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae). *The American midland naturalist*, 147(2): 326–337. DOI: [10.1674/0003-0031\(2002\)147\[0326:FAOAF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2002)147[0326:FAOAF]2.0.CO;2)
- Wetzel J. E., Poly W. J., Fetzner Jr. J. W., 2005. *Orconectes pardalotus*, a new species of crayfish (Decapoda: Cambaridae) from the lower Ohio River with notes on its life history. *Aqua, Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, 10(2): 57–72.

- Woodlock B., Reynolds J. D., 1988. Reproduction in an Irish lake population of the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lerehoullet). *Freshwater Biology*, 19(1): 79–86. DOI: [10.1111/j.1365-2427.1988.tb00329.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1988.tb00329.x)
- Yasuzumi G., Kaye G. I., Pappas G. D., Yamamoto H., Tsubo I., 1961. Nuclear and cytoplasmic differentiation in developing sperm of the crayfish, *Cambaroides japonicus*. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 53(2): 141–158. DOI: [10.1007/BF00339438](https://doi.org/10.1007/BF00339438)
- Yasuzumi G., Lee, K. J., 1966. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 73(3): 384–404. DOI: [10.1007/BF00329018](https://doi.org/10.1007/BF00329018)
- Yazicioglu B., Linhartova Z., Niksirat H., Kozák P., 2014. First report of intersex in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). *Crustaceana*, 87(13): 1559–1566. DOI: [10.1163/15685403-00003370](https://doi.org/10.1163/15685403-00003370)
- Yazicioglu B., Hamr P., Kozák P., Kouba A., Niksirat H., 2016. Fine structure of the spermatozoon in three species of Cambaridae (Arthropoda: Crustacea: Decapoda) *Cambarus robustus*, *Orconectes propinquus* and *Orconectes rusticus*: a comparative biometrical study. *Journal of Life and Environmental Sciences*, 4, e2363. DOI: [10.7717/peerj.2363/supp-1](https://doi.org/10.7717/peerj.2363/supp-1)

7.1. Internetové odkazy

Cambarellus, 2007.

<<http://www.cambarellus.com/Zwergflussekrebse/Cambarellus-patzcuarensis-sp-orange/Cambarellus-patzcuarensis-sp-orange-Bilder.htm>>. Navštíveno – 18.4.2020

Biolib, 1999 - *Procambarus virginalis*

<<https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id135737/?taxonid=306900&type=1>>. Navštíveno – 23.3.2021

Biolib, 1999 - *Faxonius limosus*

<<https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id226527/?taxonid=32920>>. Navštíveno – 23.3.2021

8. Abstrakt

V poslední době se ultrastruktura račích spermií stává stále více studovaným tématem. Doposud byla ultrastruktura prozkoumána u asi patnácti druhů sladkovodních druhů ze všech čtyř račích čeledí, nicméně doposud nebyla studována u skupiny trpasličích raků (podčeledi Cambarellinae). Cílem této práce bylo detailně popsat ultrastrukturu spermií dvou trpasličích druhů raků, konkrétně raka mexického *Cambarellus patzcuarensis* a raka brazoského *C. texanus*. Tyto druhy byly následně porovnávány s druhy již studovanými za pomoci morfologických znaků a biometrických údajů. Ultrastruktura jejich spermií vykazuje obecně známý vzorec, který zahrnuje v přední části akrozom a subakrozom a v protilehlé části jádro. Dále pak jsou přítomna pro nadčeď Astacoidea typická radiální ramena, která se obalují kolem jádra s akrozomem, celá buňka je pak uzavřena v extracelulární kapsli. Výsledky ukazují, že velikost akrozomů u zástupců Parastacidae je nejmenší, zatímco raci čeledi Astacidae vykazují největší akrozom. Zjištění současné studie poukazuje na střední velikost akrozomu trpasličích raků, tak Cambaridae obecně, byť se zde studovaní zástupci velikostně nacházejí na spodní hranici této čeledi a rak brazoský byl blízký zástupcům čeledi Parastacidae. Závěrem je důležité říct, že kombinace morfologických znaků a biometrických údajů akrozomů spermií je do značné míry schopna rozlišit jednotlivé račí skupiny. Tato studie tak může napomoci k vymezení dalších doposud nestudovaných druhů a může být hodnotným podkladem pro navazující výzkum ultrastruktury a biometrie račích spermií.

Klíčová slova: spermie, ultrastruktura, rak mexický, rak brazoský, trpasličí raci

9. Abstract

Recently, the ultrastructure of crayfish spermatozoa has become an increasingly studied topic. Up to now, the ultrastructure has been studied and defined in about fifteen species of freshwater species from all four crayfish families, however it has not yet been studied in a group of dwarf crayfish (subfamily Cambarellinae). Present work aimed to describe the spermatozoa ultrastructure of two dwarf crayfish species, specifically the Orange dwarf crayfish *Cambarellus patzcuarensis* and the Texas dwarf crayfish *C. texanus*. These species were then compared with the species already studied using morphological traits and biometric data. The ultrastructure of their spermatozoa shows commonly known patterns that include the acrosome and subacrosome in the front and the nucleus on the opposite side of the cell . Furthermore, radial arms typical for the superfamily Astacoidea that wrap around the nucleus and the whole cell enclosed by the extracellular capsule. The results show that the size of the acrosomes of Parastacidae members is the smallest, while the crayfish of the Astacidae family show the largest acrosome. The current study points out a medium-sized acrosome of dwarf crayfish and Cambaridae in general, although they are located at the lower margin of this family with the Brazos crayfish being close to representatives of the Parastacidae. In conclusion, it is important to say that the combination of the morphological traits and biometric data of sperm acrosomes allows distinguishing individual crayfish groups to a large extent. This study may help to identify other species that have not been studied so far and could be a valuable basis for subsequent research of the ultrastructure and biometrics of crayfish spermatozoa.

Key words: sperm, ultrastructure, Orange dwarf crayfish, Texas Dwarf Crayfish, dwarf crayfish