

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra zoologie



Vývojová morfogeneze přichytných žláz a orgánů u nižších obratlovců

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Martin Minařík

Vedoucí práce: Mgr. Robert Černý, Ph.D.

Praha 2009

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Roberta Černého, Ph.D. a s použitím citované literatury.

V Praze dne 29.4.2009

.....

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli, Mgr. Robertu Černému, Ph.D., za veškeré užitečné rady týkající se bakalářské práce i dalšího studia. Mé díky za pomoc a podnětné připomínky patří též známým a kolegům. Na závěr děkuji také rodičům za trpělivost a podporu během mého studia.

Obsah

Obsah.....	1
Abstrakt.....	2
1. Úvod.....	3
2. Obecné charakteristiky přichytných žláz a orgánů	4
3. Typy přichytných žláz a orgánů	9
3.1 Adhezivní orgány nižších strunatců	9
3.2 Adhezivní orgány třídy <i>Sarcopterygii</i>	11
3.2.1 Cementové orgány dvojdyšných	11
3.2.2 „Balancery“ ocasatých obojživelníků	12
3.2.3 Cementové žlázy žab	15
3.3 Adhezivní orgány třídy <i>Actinopterygii</i>	18
3.3.1 Cementové orgány bazálních skupin paprskoploutvých.....	18
3.3.2 Cementové žlázy kostnatých (<i>Teleostei</i>).....	21
4. Morfogeneze přichytných žláz a orgánů	25
4.1 Morfogeneze cementové žlázy drápatky <i>Xenopus laevis</i>	25
4.2 Morfogeneze cementových orgánů bichira <i>Polypterus senegalus</i>	31
5. Závěr	35
6. Seznam použité literatury	37
6.1 Přímé citace.....	37
6.2 Nepřímé citace	39

Abstrakt

Různé typy adhesivních orgánů nacházíme u většiny skupin obratlovců s primárně vodními larvami. Jejich úlohou je obvykle umožnit larvě přichycení k substrátu po vylíhnutí z vajíčka pomocí mukózního sekretu a setrvání na bezpečném místě, dokud larva není schopna přijímat potravu nebo aktivně plavat. Jejich morfologie se mezi jednotlivými skupinami často značně liší, avšak adhezivní buňky, jimiž jsou orgány tvořeny, vykazují řadu společných znaků. Mnozí autoři udávají, že adhezivní orgány alespoň některých skupin mohou být homologické. Úvahy na toto téma jsou komplikovány skutečností, že cementové orgány bichira *Polypterus senegalus* a kaprouna *Amia calva* dle některých autorů vznikají z entodermu, zatímco srovnatelné struktury u všech ostatních skupin jsou zřejmě ektodermální. Nejvíce prostudovanou adhesivní strukturou je cementová žláza drápatky *Xenopus laevis*. Na jejím příkladu byly popsány některé důležité markery a interakce genů vedoucí k indukci žlázy. K zodpovězení této otázky bude tedy nutné nejprve podobně prostudovat vznik cementových orgánů u jiných skupin. Vhodné bude použití již známých markerů a srovnání genů, exprimovaných ve vznikajících orgánech.

Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o adhesivních strukturách nižších obratlovců. V mé diplomové práci se chci podrobněji věnovat morfogenezi cementových orgánů bichira a srovnání s dalšími vhodnými organismy.

Abstract

Various types of adhesive organs are present among almost all groups of these vertebrates which have primarily aquatic larvae. Their function is usually to allow the larva to attach itself to a substrate immediately after hatching using a mucous secretion, and remain in a safe place until it is capable of feeding or active swimming. The morphology of these structures shows conspicuous differences between some taxa, but adhesive cells, the main mass of the organs, show many common features. Many authors claim that adhesive organs can be homologous among at least some groups of vertebrates. Reflections on this topic are complicated by the findings of some authors, suggesting that cement organs of the bichir (*Polypterus senegalus*) and the bowfin (*Amia calva*) arise from endodermal layer, whilst similar structures in other taxa are probably ectodermal in origin. The most examined adhesive structure is the cement gland of *Xenopus laevis*. Some important markers and gene interactions leading to the cement gland formation were first described on this model. Thus, in order to resolve the question of homology, it will be necessary to identify the mechanisms of the cement organ development in other taxa. Using the markers which were previously described in *Xenopus* or comparing expression patterns in developing cement organs will be suitable.

This bachelor thesis reviews the existing knowledge of adhesive structures in lower vertebrates. In my next study I will focus on the morphogenesis of the cement organs in the bichir *Polypterus senegalus* and their comparison with other taxa.

Klíčová slova: *Polypterus senegalus*, adhezivní orgány, cementové žlázy, larvy, obratlovci

Keywords: *Polypterus senegalus*, adhesive organ, cement gland, larvae, vertebrates

1. Úvod

Různé typy přichytných žláz a orgánů jsou známy u primárně vodních larev zástupců téměř všech hlavních skupin nižších obratlovců. Jako orgány zajišťující adhezi ke vhodnému povrchu těsně po vylíhnutí se plně vyvíjejí již ve vajíčku a relativně dlouhou dobu jsou dominantní strukturou na hlavě larvy.

Jejich přítomnost u řady ve vodě se vyvíjejících larev vyvolává otázku, zda a jak mohou být tyto struktury homologické. Kromě značných morfologických odlišností mezi jednotlivými skupinami je zodpovězení této otázky komplikováno také skutečností, že zatímco u většiny skupin adhezivní orgány vznikají z ektodermu, u primitivních paprskoploutvých ryb je původ morfologicky velice podobných struktur zřejmě entodermální. Proto tedy bude zajímavé se otázce morfogeneze a úrovně případné homologie adhezivních orgánů u larev nižších obratlovců věnovat v další práci.

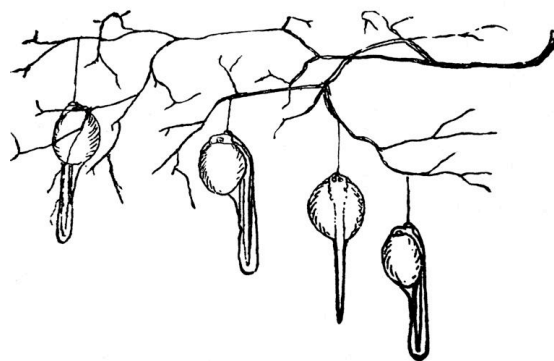
Hlavním cílem mé bakalářské práce je tedy shrnutí současných poznatků týkajících se všech typů larválních adhezivních a cementových žláz, které se vyskytují u různých skupin, od kopinatce po obojživelníky. První část práce definuje typy adhezivních orgánů popsanych u jednotlivých skupin nižších obratlovců různými autory a okrajově se věnuje také sekreторickým žlázám kopinatce a adhezivním papilám pláštěnců. Další část práce se pak podrobněji věnuje morfologii, vývoji a výskytu orgánů v rámci dané skupiny. Pokud je to možné, jsou u jednotlivých organismů nastíněny také ekologické aspekty vývoje konkrétního typu adhezivních struktur. V poslední části práce se věnuji podrobnějšímu rozboru morfogeneze nejdůležitějších vybraných typů adhezivních orgánů u v tomto směru nejlépe prostudovaného organismu, drápatky *Xenopus laevis*, a u bichira *Polypterus senegalus*, kterému se chystám věnovat v diplomové práci.

2. Obecné charakteristiky přichytných žláz a orgánů

Jednou z nejvýznamnějších struktur na hlavě mnoha ve vodě se vyvíjejících larev nižších obratlovců bývají různé typy adhezivních a cementových žláz a orgánů. Přestože byla často studována a srovnávána jejich morfologie v rámci vybraných skupin, málokteré práce se věnují širšímu srovnání v rámci nižších obratlovců a otázce jejich případné homologie a pokud ano, pak jen zmínkou v úvodu či závěru. Následující přehled shrnuje především společné znaky jednotlivých typů adhezivních žláz u všech hlavních skupin, které těmito strukturami disponují, tedy kopinatců (*Acrania*), pláštěnců (*Tunicata*) a nižších obratlovců (*Anamnia*).

Adhezivní žlázy a orgány jsou různě organizovaná uskupení specializovaných buněk na hlavě larvy, která slouží k její adhezi k podkladu těsně po vylíhnutí z vajíčka. Tato funkce je pro larvu zásadní z různých důvodů. Může zajišťovat setrvání na místě líhnutí, dokud není larva schopna přijímat potravu a dokud nespotřebuje zásoby žloutkového vaku, umožnit setrvání v lépe okysličených horních vrstvách vodního sloupce, nebo naopak přichycení k substrátu na dně při skrývání se před predátorem (Britz et al., 2000). Podobné struktury pak dle očekávání chybí u druhů se specializovanými typy larválního vývoje nebo rodičovské péče, například u cichlid inkubujících vajíčka v tlamě (Arnold et al., 1968) nebo u žab s přímým vývojem (Nokhbatolfighahai a Downie, 2005). Na druhou stranu u jiných skupin ryb s rodičovskou péčí mohou umožnit setrvání na místě vylíhnutí.

Jak naznačuje využití adhezivních orgánů, jsou tyto struktury čistě larválním orgánem, který se objevuje v časně embryogenezi, a nejvíce se rozvíjí těsně před líhnutím, kdy jsou připraveny začít vylučovat lepkavý sekret, jakmile se larva uvolní z vaječných obalů do vodního prostředí (Altig a McDiarmid, 1999; Agassiz, 1878, podle Balfour a Parker, 1882; Britz et al., 2000). Jak se larva vyvíjí, ztrácí tyto žlázy na významu a mizí obvykle brzy poté, co získá schopnost samostatného pohybu a příjmu potravy (Britz et al., 2000). Dospělí jedinci nenesou žádné stopy přítomnosti dřívějších nápadných orgánů. Jednou z výjimek by mohl být



Obr. 1. Larvy *Hyperopisus bebe* (*Actinopterygii*, *Osteoglossiformes*) visící z rostliny v hnízdě pomocí sekretu vylučovaného cementovým orgánem. Převzato z Budgett (1901).

jeseter, u něhož von Kupfer (1893; podle Eyclesheymer a Wilson, 1908) udává, že z nefunkčních cementových orgánů vznikají hmatové vousy.

U různých skupin obratlovců se pro tento typ struktur vžila různá označení. U kopinatce *Branchiostoma lanceolatum* mluví Stach (2000) o rostrální sekretorické žláze (rostral secretory gland), zatímco trojice adhezivních žláz u larev pláštěnců je ve většině prací označena jako adhezivní papily (adhesive papillae). Specializované orgány na spodní straně hlavy larev dvojdyšných (*Lepidosiren*, *Protopterus*) nazývá Kerr (1900) i Budgett (1901) ve své práci cementovými orgány (cement organ).

Různorodost označení a jejich historický vývoj je vhodné ilustrovat na příkladu adhezivních struktur obojživelníků. Několik starších názvů nalezneme například u Sive a Bradley (1996), věnujících se larvám žab, kteří kromě „cement gland“ a „adhesive organ“ jmenují především označení „the sucker“ (jinde také „ventral sucker“ či „sucking disc“), vycházející z dřívější představy, že k adhezi k substrátu dochází přísátím vlivem podtlaku. Značná část autorů (včetně Sive a Bradley, 1996) dnes upřednostňuje označení cementová žláza (cement gland), případně adhezivní orgán (adhesive organ; Pennati et al., 2000). Ve své práci se budu držet prvního jmenovaného termínu, používaného ve většině prací věnujících se detailně struktuře a morfogenezi cementové žlázy drápatky *Xenopus laevis*. Na tomto místě je třeba zmínit také další žlázu, vyskytující se na hlavě v období těsně před líhnutím, nazývanou anglicky „hatching gland“. Ta slouží k rozrušení vaječných obalů během líhnutí a nejedná se tedy o adhezivní strukturu (Drysdale a Elinson, 1993).

U ocasatých obojživelníků nastává podobná situace. U těchto živočichů se žlázy, produkující lepkavý sekret, nachází na koncích páru tyčinkovitých výběžků, které se vyvíjejí na laterální straně hlavy před dokončením vývoje končetin (Crawford a Wake, 1998). Fox (1985) uvádí ve výčtu dříve používaných termínů například „balancing sticks“, „stalked suckers“ a řadu názvů v dalších jazycích, jako německé „Haftorgane“ nebo „Rusconische Häkchen“, francouzské „crochets d'adherence“, či dokonce japonské „Heikôshijijô“. Název Rusconiho háčky (Rusconische Häkchen, crochets de Rusconi) vychází ze skutečnosti, že jedním z prvních, kteří si těchto struktur blíže všimli, byl právě Rusconi na počátku 19. století. V české literatuře toto označení používá například Zwach (1990). Tento a z něj odvozené termíny však opět dokumentují chybnou představu, že principem přichycení je spíše zaháknutí než adheze pomocí mukózního sekretu. Proto se v současnosti ujal anglický termín balancer, který vystihuje další důležitou funkci těchto orgánů, kterou je stabilizace hlavy ve vyvýšené poloze před dokončením vývoje předních končetin (Duellman a Trueb, 1986).

U paprskoploutvých ryb je situace komplikovaná vzhledem ke skutečnosti, že se pro adhezivní struktury nevžil jednotný název, a to ani v rámci skupiny *Teleostei*. Různí autoři tak používají termíny adhezivní orgán (adhesive organ; Eyclesheymer a Wilson, 1908), přichytný orgán (attachment organ; Britz et al., 2000), cementový orgán (cement organ; Kerr, 1907), případně cementová žláza (cement gland; GropPELLI et al., 2003). Tyto termíny lze tedy považovat za rovnocenné, a tak také budou v dalším textu používány.

Přinejmenším stejnou rozmanitost jako názvy vykazují i samotné adhezivní struktury, tedy alespoň pokud jde o lokalizaci a vnější morfologii. Rostrální sekretorická žláza kopinatce je pouze drobná eliptická vyvýšenina v blízkosti úst larvy, tvořená zesílenou vrstvou epidermis (Stach, 2000). Už u pláštěnců ale nacházíme zřetelné adhezivní orgány tvořené třemi papilami výrazně vyčnívajícími nad povrch (Sotgia et al., 1998). U dvojdyšných pak vzniká nápadný orgán, tvořený masivním valem obklopujícím vlastní sekretorické buňky na spodní straně hlavy (Kerr, 1900). Podobně lze popsat a lokalizovat také cementové žlázy žab, které jsou buď párové (Nokhbatolfoghahai a Downie, 2005), nebo splývají v jeden mediálně uložený orgán, lišící se tvarem u jednotlivých čeledí. Zvláštní pozici mezi adhezivními orgány zaujímají již zmiňované balancery ocasatých obojživelníků, které svou specializovanou morfologií vybočují z obecných charakteristik adhezivních žláz. Zdá se, že jejich úloha je především stabilizační a adheze pomocí sekretorických buněk je tedy jen jednou z hlavních funkcí orgánu. Balancery se vyvíjí po obou stranách hlavy za očima a k sekreci mukózního sekretu dochází na jejich kyjovitých zakončeních (Crawford a Wake, 1998).

Ani u paprskoploutvých ryb nenalezneme jediný typ orgánů. Zatímco adhezivní orgány některých bazálních skupin, například bichirů (*Polypteriformes*), vznikají jako dva výrazné kulovité útvary nad ústy (Kerr, 1907), u kostnatých ryb (*Teleostei*) mohou být tyto útvary zmnoženy a rozmístěny na dorzální straně hlavy (*Cichlidae*; GropPELLI et al., 2003), případně mohou úplně chybět a jejich úlohu pak plní část vlastní hlavové epidermis vybavená adhezivními buňkami, volně rozptýlenými v určité oblasti namísto koncentrace do zřetelně definovaných orgánů (*Gymnotiformes*; Britz et al., 2000).

Ještě zajímavější než rozdíly v morfologii a lokalizaci adhezivních orgánů a žláz se však jeví otázka jejich embryonálního původu. Zdá se, že u některých bazálních paprskoploutvých, přinejmenším u bichirů a kaprounů, totiž cementové orgány vznikají jako vychlípeniny přední části entodermu, které se posléze oddělí a otevřou do vnějšího prostředí (Kerr, 1907; Eyclesheymer a Wilson, 1908). Původem cementových orgánů jsou tedy tyto organismy jedinečné v rámci celých strunatců, neboť podle veškeré dostupné literatury, jak

bude ilustrováno v další části práce, vznikají odpovídající struktury od kopinatců po kostnaté ryby a obojživelníky z ektodermu.



Obr. 2. Larva bichira (*Polypterus senegalus*), stadium 32. Šipka vyznačuje pozici cementových orgánů, vznikajících jako vychlípeniny entodermu. Upraveno z Kerr (1907).

Než se dostanu k další kapitole, věnující se podrobnému popisu a charakteristice konkrétních typů adhezivních žláz a orgánů u jednotlivých skupin, je nutné uvést základní vlastnosti buněk, jimiž jsou tyto orgány tvořeny a které zajišťují jejich funkci.

Adheze k substrátu je dosaženo produkcí mukózního sekretu (Groppelli et al., 2003) ze sekretujících buněk adhezivního orgánu. Přes značné morfologické odlišnosti adhezivních struktur u jednotlivých skupin se zdá, že tyto buňky vykazují značnou podobnost. Vysoké sekreторické aktivitě je podřízena diferenciace buněčných organel se zásadní úlohou drsného endoplasmatického retikula, které vyplňuje značnou část objemu buňky a zatlačuje jádro k její bazální části. Produkty syntézy se hromadí v sekreторických váčcích lokalizovaných při apikální membráně buněk (Picard, 1976; podle van Evercooren a Picard, 1978; Bennemann a Pietzsch-Rohrschneider, 1978).

Podstatnou část buněk cementových žláz někdy tvoří také nesekreторické epiteliální buňky odvozené z epidermis (Britz et al., 2000). Ty zajišťují distribuci adhezivního sekretu na povrchu orgánu a zvětšení povrchu pro zlepšení přilnavých schopností a jsou k tomuto účelu často vybaveny ciliemi (Pennati et al., 2000), různými druhy výběžků a nápadně zvrásněným povrchem (Britz et al., 2000).

Kromě vlastní adhezivní funkce orgánů je často zdůrazňována také funkce smyslová, která umožňuje larvě rozpoznat, kdy dosáhla vhodného substrátu, a přestat se tedy pohybovat. U mnoha obratlovců, například žab (Roberts a Blight, 1975), ocasatých obojživelníků (Crawford a Wake, 1998) a některých skupin paprskoploutvých ryb (Groppelli et al., 2003), byla prokázána inervace větví pátého hlavového nervu (*n. trigeminus*). Podobně jsou inervovány také adhezivní papily pláštěnců (Sotgia et al., 1998).

Jak naznačil tento přehled, adhezivní žlázy a orgány nalezneme u většiny hlavních skupin strunatců, jejichž larvy se vyvíjejí ve vodě. Výjimkou jsou pouze paryby, kruhoústí a

červoi. V této kapitole jsem shrnul základní charakteristiky těchto larválních struktur. Je zřejmé, že přes mnohdy značné morfologické odlišnosti vykazují jednotlivé typy adhezivních orgánů přítomnost mnoha společných znaků. Přesto je otázka jejich homologizace studována zřídka a jednotliví autoři dochází k často odlišným závěrům. Situace je komplikována skutečností, že, jak jsem naznačil výše, u některých paprskoploutvých ryb mohou cementové orgány zřejmě vznikat z entodermu.

Pro budoucí detailnější studium cementových orgánů bichira *Polypterus senegalus* a nakonec i jakékoli zamýšlení se nad otázkou homologizace larválních adhezivních struktur nižších obratlovců je nutné tyto orgány poznat blíže. Jejich detailní morfologii, ultrastrukturu, funkci a morfogenezi se tedy věnují následující dvě kapitoly.

3. Typy přichytných žláz a orgánů

Následující kapitola shrnuje dostupné informace o jednotlivých typech adhezivních struktur nižších obratlovců. Pro úplnost je ovšem nutné neopomenout ani podobné struktury, které nalezneme u nižších strunatců, tedy kopinatců (*Acrania*) a pláštěnců (*Tunicata*). Těm se věnuji v první podkapitole. V následujících dvou podkapitolách pak pojednávám o adhezivních orgánech samotných nižších obratlovců (*Anamnia*), pod které spadají dvě třídy, *Sarcopterygii* a *Actinopterygii*. V každé podkapitole je shrnut výskyt orgánů v rámci dané skupiny, dále pak morfologie, histologie, funkce orgánu a základní informace o jeho morfogenezi, pokud není probírána podrobněji ve třetí kapitole.

3.1 Adhezivní orgány nižších strunatců

Adhezivní orgány nacházíme kromě obratlovců také u nižších strunatců, a to jak u kopinatců, tak u pláštěnců, konkrétně u sumek (Sotgia et al., 1998). Stejně jako u níže popisovaných skupin, také u kopinatce se jedná o přechodný larvální orgán, který s vývojem larvy zaniká (Stach, 2000). Sumkám naopak slouží jako orgán k přichycení při metamorfóze a dospělý jedinec již zůstává přisedlý trvale.

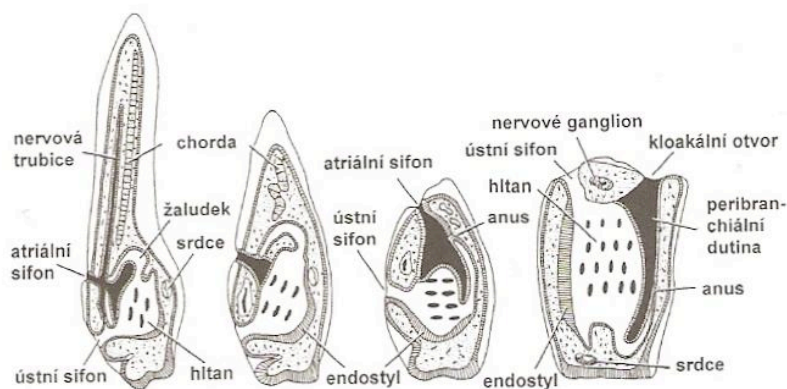
Stach (2000) ve své práci podrobně popisuje adhezivní žlázu u raných larev kopinatce *Branchiostoma lanceolatum*, kterou nazývá rostrální sekretorická žláza (rostral secretory gland). Podobné struktury byly popsány též u ostatních druhů rodu, u nichž jsou k dispozici larvální stádia. Tyto žlázy jsou tvořeny eliptickým, téměř kruhovitým zesílením ektodermu na pravé ventrální straně přední části larvy, majícím šířku zhruba 25 μm, s monociliátními buňkami podobnými buňkám ostatní epidermis, avšak více protaženými. Buňky leží na vrstvě extracelulární matrix a jsou nápadně polarizované, s velkými, bazálně uloženými jádry s jadérkem a mitochondriemi. Cytoplasma je vyplněna rozsáhlými cisternami drsného endoplasmatického retikula (rER), stejně jako u části hlouběji ležících myotheliálních buněk rostrálního coelomu. Golgiho komplex je uložen apikálně. Bičík je lemován nízkým límečkem. V celém objemu cytoplazmy je možno hojně nalézt váčky s granulárním obsahem, které jsou zřejmě sekretovány apokrinně. Podobné váčky se vyskytují také u výše zmíněných myotheliálních buněk.

Zřetelná polarizace buněk naznačuje sekretorickou funkci celé struktury, z přítomnosti váčků v celém objemu cytoplazmy navíc Stach usuzuje na transport váčků z myotheliálních buněk coelomu přes bazální membránu buněk vlastní rostrální žlázy. Význam orgánu u larvy

kopinatce však dosud zůstává neznámý, neboť se zdá, že larvy tráví většinu života planktonně (Stokes, 1997; podle Stach, 2000) a adhezivní funkce, kterou navrhuje například van Wijhe (1926; podle Stach, 2000), je tedy nepravděpodobná. Webb (1969) uvažuje o účasti žlázy na zachytávání potravy.

Van Wijhe kromě výše popsané žlázy popisuje podobnou strukturu na levé straně a přidává k nim ještě nepárovou třetí žlázu, odpovídající orální papile zmiňované ve Stachově práci. Trojici žláz pak homologizuje s adhezivními papilami sumek. Frankenberger (1927; podle Stach, 2000) dokonce uvažuje o homologii s cementovými orgány dvojdyšných a žab. Podle Stacha však pro toto tvrzení chybí důkazy, levou žlázu u *B. lanceolatum* nenachází a poukazuje na strukturální odlišnost orální papily.

Na rozdíl od kopinatců je úloha adhezivních žláz u sumek (Ascidia, Tunicata) zcela zřejmá. Ektodermální struktury nazývané adhezivní papily (adhesive papillae) se nachází na anteriorní části larvy ventrálně od ústního



Obr. 3. Průběh metamorfózy u sumky. Přisednutí k substrátu je zajištěno trojicí adhezivních papil na přední straně larvy. Převzato z Roček (2002).

otvoru a umožňují adhezi k povrchu, na kterém dojde k přeměně v trvale přisedlého dospělého. Žlázy bývají rozmístěny do tvaru trojúhelníku, avšak jejich počet se u různých druhů liší (Sotgia et al., 1998). U larev *Ciona intestinalis* (Katz, 1983) a *Phallusia mamillata* (Sotgia et al., 1998) jsou papily tři, dvě ležící dorzálně a jedna ventrálně.

Žlázy sumky druhu *Phallusia mamillata* sestávají ze dvou typů buněk (Sotgia et al., 1998). První, periferní, vykazují sekretorickou aktivitu a jsou vyplněny rozvinutým rER. Plynule navazují na okolní ektodermální buňky, avšak odlišují se svým protáhlým tvarem s apikálními částmi tvořícími vyvýšeninu nad ostatním povrchem larvy. Uprostřed papily se nacházejí ještě protáhlejší centrální buňky s povrchem zvětšeným hojnými výběžky cytoplasmu (microvilli), jež jsou zřejmě primárními senzoryckými neurony zajišťujícími smyslovou funkci. Po většinu života larvy zůstává celá struktura zakryta tunikou a postrádá tedy adhezivní funkci. S pokračujícím vývojem však začínají periferní buňky sekretovat adhezivní tekutinu, která se hromadí pod tunikou a je uvolněna jejím rozrušením na počátku

metamorfózy, což se může dít opět za přispění některých složek vylučovaného sekretu (Sotgia et al., 1998).

Zajímavá je též senzorická funkce adhezivních papil, která zřejmě umožňuje larvám zvolit správný povrch na základě hmatových a chemických podnětů (Burighel a Cloney, 1997; podle Sotgia et al.; 1998). To může být pro živočicha, jehož dospělí jedinci jsou trvale přisedlí, zcela zásadní. Senzorické centrální buňky papil jsou inervovány větvemi papilárního nervu, který se podle Sotgia et al. (1998) nejspíše podílí na regulaci sekrece, umožňující adhezi po vybrání vhodného substrátu. Dle celkové struktury a morfogeneze orgánu homologizují různí autoři adhezivní papily s adhezivními orgány některých obratlovců (de Bernardi a Fascio, 1994; dle Sive a Bradley, 1996).

3.2 Adhezivní orgány třídy *Sarcopterygii*

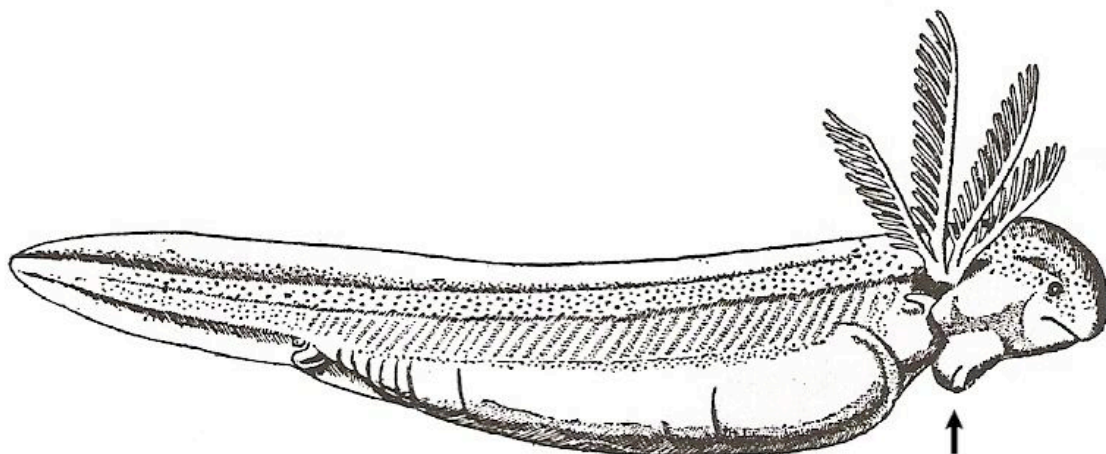
Třída *Sarcopterygii* náleží do nadtřídy kostnatých ryb (*Osteichthyes*) a zahrnuje podtřídy *Coelacanthimorpha* (lalokoploutví), *Dipnoi* (dvojdyšní) a *Tetrapoda* (čtyřnožci). (Tree of Life Web Project, 1995). U latimérie, tedy zástupce první zmiňované skupiny, rodí samice živá mláďata. Dvojdyšní a část čtyřnožců však kladou vajíčka do vody, ve které se líhnou larvy často vybavené cementovými orgány nebo jinými strukturami s podobnou funkcí. V další části se tedy budeme zabývat cementovými orgány dvojdyšných a žab a takzvanými balancery (balancers) ocasatých obojživelníků.

3.2.1 Cementové orgány dvojdyšných

Vývoj cementových orgánů u larev je poměrně podrobně popsán na afrických i amerických bahnících. První skupina zahrnuje jediného zástupce, bahníka amerického (*Lepidosiren paradoxa*), ve druhé najdeme čtyři druhy rodu *Protopterus*, přičemž Budgett (1901) se věnuje vývoji larev bahníka západoafrického (*Protopterus annectens*). Oba druhy budují v době rozmnožování jakási hnízda v podobě děr ve dně (*Lepidosiren paradoxa*) nebo v zemi v blízkosti vody (*Polypterus annectens*), do kterých kladou vajíčka a v nichž se vyvíjí larvy. Vylíhlým larvám pomáhají cementové orgány setrvat v horních částech hnízda a neklesnout ke dnu do zbytků rostlinného materiálu, kde by jim hrozilo udušení (Budgett, 1901).

Orgány bahníka podle Kerra (1900) zcela odpovídají cementovým žlázám žabích pulců, jak svou funkcí, tak svým vývojem a morfologií (uvádí shodnou srpkovitou podobu

žlázy u bahníka *Lepidosiren paradoxa* a ropuchy *Bufo bufo*). Vyvíjí se u embrya brzy po vzniku základů žaberních oblouků, tedy později než u žab, u kterých se zakládají již před uzavřením neurální trubice. Po vylíhnutí se nadále zvětšují a produkují adhezivní sekret, dokud se larvy nezačnou aktivně pohybovat. Po opuštění hnízda však rychle degenerují (Kerr, 1900; Budgett, 1901).



Obr. 4. Larva *Lepidosiren paradoxa*. Šipka vyznačuje pozici cementového orgánu. Podle Kerr, převzato z Goodrich (1909).

Vyvíjející se orgán má, jak bylo zmíněno výše, srpkovitý tvar s cípy směřujícími kraniálně a nachází se poměrně daleko za ústy na spodní straně hlavy. S pokračujícím vývojem larvy se v oblasti orgánu tvoří nápadný val, na jehož vrcholu se otevírá vlastní cement produkující žlábk. Žádná z citovaných prací se však detailně nezabývá morfogenezí orgánu. Dle oběma autory často zmiňované homologie s cementovými žlázami žab lze usuzovat na jejich shodný ektodermální původ, avšak vhodné histologické řezy pro doložení tohoto předpokladu ani jedna z prací neobsahuje.

3.2.2 „Balancery“ ocasatých obojživelníků

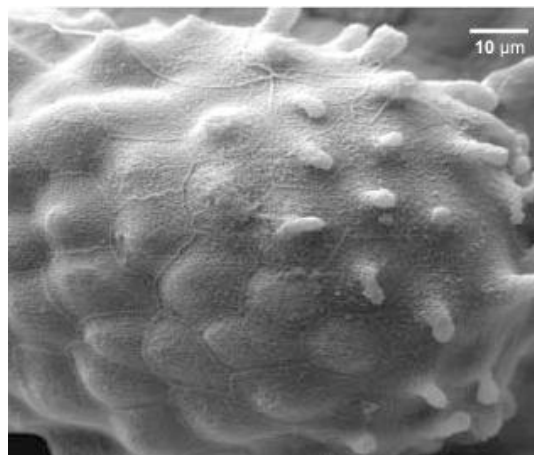
Zvláštní tyčinkovité struktury, nacházející se po stranách hlavy larev některých ocasatých obojživelníků, jsou poměrně dobře prostudovaným typem adhezivních orgánů. Na jejich morfologii zaujme především značná odlišnost od ostatních adhezivních larválních orgánů. Párové balancery vyrůstají z ektodermu v oblasti vyvíjejícího se mandibulárního oblouku posteroventrálně od oka jako tyčinkovité výběžky pokryté kuboidálním epitelem, jejichž osu tvoří vrstva kolagenních vláken, která může sloužit jako vazivová kostra

poskytující orgánu oporu (Crawford a Wake, 1998). Na kyjovitě rozšířených koncích se nachází vlastní adhezivní žláza (Duellman a Trueb, 1986; Brunelli et al., 2006).



Obr. 5. Larva *Pleurodeles waltl* ve stádiu 35. Šipky označují vyvinuté balancery. Upraveno podle Shi a Boucaut (1995).

Napříč všemi skupinami ocasatých obojživelníků, u nichž se vyskytují, vykazují balancery značnou uniformitu (Crawford a Wake, 1998). Jejich povrch je tvořen dvou až třívrstevnou epidermis. Buňky vnější vrstvy mají velká nepravidelná jádra s nápadnými jádérky, rozvinutým rER a Golgiho komplexem, z jehož cisteren se uvolňují sekreторické váčky. Kromě těchto váčků, naplněných zřejmě glykoproteiny, se v cytoplazmě nachází také tuková a žloutková tělíska. Povrch buněk je nápadně zvrásněný, místy opatřen microvilli (Fox, 1985) nebo sekreторickými výběžky (secretory cones) v centrální části buněk (Brunelli et al., 2006), a pokrytý mukózní vrstvou, produkovanou exocytózou obsahu sekreторických váčků. Cilie se objevují pouze v časných stádiích, na vyvinutých balancerech se již nevyskytují. Ve spodní vrstvě buněk se sekreторické váčky netvoří, avšak rER a Golgiho komplex jsou i zde nápadně rozvinuté (Brunelli et al., 2006). Epidermis na jiných částech těla larvy se liší právě méně rozvinutým rER v buňkách a také menší mírou inervace (Fox, 1985).



Obr. 6. Koncová část balanceru *Triturus italicus*. Nápadné jsou početné sekreторické výběžky. Upraveno podle Brunelli et al. (2006).

Různí autoři se věnují také inervaci balancerů v souvislosti s jejich předpokládanou senzorickou funkcí (Crawford a Wake, 1998). Fox (1985) popisuje extenzivní inervaci epidermis balanceru větví trigeminálního nervu (*ramus mandibularis nervi trigemini*). Nemyelinizované neurity prochází bazální vrstvou a pravděpodobně zprostředkovávají mechanoreceptivní funkci orgánu, která by mohla zajišťovat tzv. „stopping response“

popsanou u *Xenopus laevis* (viz níže). Mnozí autoři však uvažují též o chemoreceptivní úloze balancerů (Crawford a Wake, 1998; Brunelli et al., 2006).

Jak bylo naznačeno výše, balancery jsou struktury zastávající více funkcí. Vyvíjejí se současně se základy vnějších žaber (Shi a Boucaut 1995) a přetrvávají obvykle do vyvinutí předních končetin (Crawford a Wake, 1998). Poté jsou buď resorbovány (Brunelli et al., 2006), nebo se ulomí, ať už vlivem vnějšího prostředí, nebo autotomií, konstrikcí bazální části (Crawford a Wake, 1998). Larvám slouží především jako opora před vyvinutím končetin. Zajišťují stabilizaci hlavy ve vyvýšené poloze a brání tak zanesení žaber substrátem (Duellman a Trueb, 1986). Brunelli et al. (2007) však zdůrazňuje adhezi k substrátu jako hlavní funkci orgánu. Vorobyeva (nepublikováno, podle Crawford a Wake, 1998) uvádí, že larvy *Salamandrella keyerlingii* jsou schopny adheze ze spodní strany vodní hladiny během přijímání potravy.

Balancery se vyskytují u zhruba poloviny druhů z čeledí *Hynobiidae*, *Salamandridae*, *Ambystomatidae* (Duellman a Trueb, 1986), konkrétně u těch, které se rozmnožují v tůních, tedy ve stojaté vodě. Tyto druhy se též vyznačují dlouhými vnějšími žábami, pomalejším vývojem končetin a také větším počtem menších vajíček. Larvy se tedy líhnou méně vyvinuté a musí začít dříve přijímat potravu, přičemž potřebnou oporu jim v té době poskytují právě balancery. Podle Crawford a Wake (1998) se tedy balancery vyskytují u těch druhů, jejichž larvy začnou přijímat potravu před vyvinutím předních končetin. Naopak druhy tekoucích vod jsou opatřeny značnými zásobami žloutku a líhnou se tedy s již vyvinutými končetinami. Crawford a Wake (1998) se věnují také fylogenetické distribuci balancerů a dochází k závěru, že se balancery u ocasatých obojživelníků vyvinuly pouze jednou a poté došlo několikrát k jejich druhotné ztrátě. Jelikož chybí u bazální čeledi *Sirenidae*, přestože patří mezi typické skupiny množící se ve stojatých vodách, vznikly zřejmě až po jejím oddělení, tedy u společného předka všech pokročilejších čeledí.

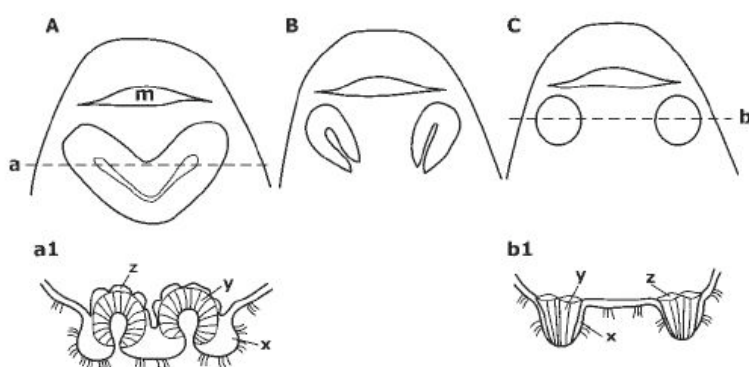
Homologie s ostatními adhezivními orgány je, i vzhledem k malé morfologické podobnosti, stále nejasná. Zatímco Noble (1931; podle Crawford a Wake, 1998) balancery homologizuje s cementovými žlázami žab na základě inervace, Crawford a Wake (1998) soudí, že struktury homologické nejsou, jelikož první se zakládají v ektodermu asociovaném s mandibulárním obloukem, zatímco druhé v ektodermu hyoidního oblouku (Lieberkind, 1937; podle Crawford a Wake, 1998), a že balancery jsou tedy evoluční novinkou ocasatých obojživelníků. Sauka-Spengler et al. (2002) sice ukazuje, že vývoj jak balancerů, tak cementových žláz je řízen mj. expresí genu *Otx5*, avšak upozorňují, že v obou orgánech mohl

být rekrutován nezávisle a zároveň může být zodpovědný za atrakci axonů trigeminálního nervu a tedy zdánlivý náznak homologie.

3.2.3 Cementové žlázy žab

Adhezivní orgány žabích pulců, zvané obvykle cementové žlázy, jsou zřejmě nejlépe známou strukturou tohoto typu, a to především díky studiu genové regulace jejich vývoje na drápatce *Xenopus laevis*. Následující podkapitola shrnuje dosavadní poznatky o cementových orgánech žab obecně. Jejich morfogenezi u drápatky se budu detailně věnovat v samostatné kapitole v další části práce.

Cementová žláza se zakládá nejprve jako tmavě pigmentovaný proužek (Sive a Bradley, 1996) v ektodermu asociovaném s hyoidním obloukem (Lieberkind, 1937; podle Crawford a Wake, 1998), ve stejném stádiu, kdy vzniká ocasní pupen (Duellman a Trueb, 1986). Kompletně vyvinutý orgán se pak nachází na ventrální straně hlavy posteriorně k ústům a vytváří útvary tvarově do značné míry typické pro jednotlivé čeledi žab (Nokhbatolfoghahai a Downie, 2005). Zatímco u drápatky *Xenopus laevis* je žláza tvořena jediným kuželovitým výběžkem bez jakékoli invaginace, u pokročilejších skupin žlázy sice vznikají jako jediný mediálně uložený útvar, ale během dalšího vývoje, zhruba v době uzavření operkula, se rozdělují na dvě části (Duellman a Trueb, 1986). V takovém případě se orgán zakládá obvykle jako žlábek ve tvaru písmene V, směřující špičkou kaudálně, obklopený nápadným valem. Později se může žlábek rozdělit na dva podkovovité útvary v přední části, případně ještě více redukovat.



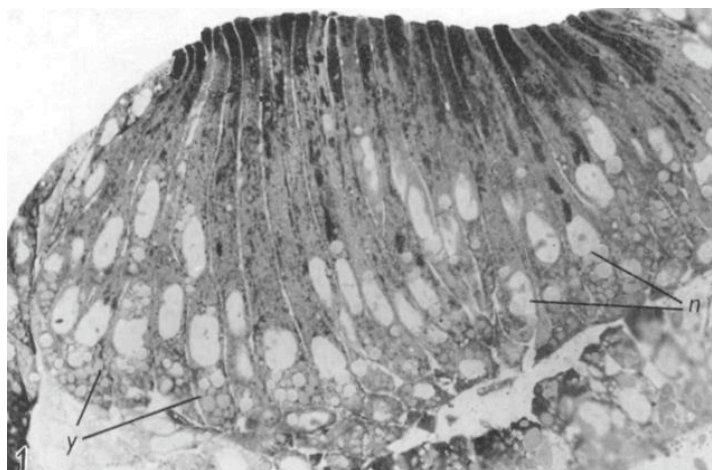
Obr. 7. Příklad fází vývoje cementové žlázy. Obrázky a1 a b1 zobrazují řezy rovinami a a b. m, ústa; x, okrajové buňky; y, sekreторické buňky; z, bazální buňky. Převzato z Nokhbatolfoghahai a Downie (2005).

Jednotlivé typy cementových žláz popisuje ve své práci podrobně Nokhbatolfoghahai a Downie (2005) a rozlišuje 5 různých směrů vývoje. Typ A, vznikající jako žlábek ve tvaru písmene V a později se rozdělující na dvě podkovovité vyvýšeniny, nalezneme například u rodu *Rana*. Typ B, například u ropuchy obecné, si udržuje původní tvar po celou dobu vývoje.

Typ C se poměrně brzy rozděluje na dvě části, které vytvoří kruhové vyvýšeniny s náznakem invaginace (*Physalaemus pustulosus*). Typ D, popsáný u *Leptodactylus validus*, se z původního tvaru poněkud zaobljuje a zaniká jako centrálně uložená jednoduchá vyvýšenina. A nakonec typ E, známý u *Xenopus laevis*, vzniká jako jediná eliptická žláza, měnící se posléze v mediálně uložený kužel.

Právě u drápatky je struktura cementové žlázy prostudována nejlépe (Pennati et al., 2000). Vlastní sekreторické buňky jsou výrazně prodloužené, z větší části pokryté vrstvou epidermis. Nezakryté zůstávají pouze nejsvrchnější části buněk. Kubické buňky pokrývající laterální části žlázy se nazývají okrajové buňky (bordering cells). Oba typy buněk jsou distribuovány dosti odlišně u jednotlivých typů žláz. U žáby sardinské (*Discoglossus sardus*) dle Pennati et al. (2000) obrvené okrajové buňky zcela pokrývají vlastní sekreční buňky, s výjimkou žlábků, v nichž je produkován adhezivní sekret. Ten je pomocí brv transportován na vrcholky valů, které se dostávají do kontaktu se substrátem. U ropuchy obecné (*Bufo bufo*) je situace podobná, avšak okrajové buňky jsou malé a bez brv. Zatímco u rodů *Xenopus*, *Hyla* a *Rana* okrajové buňky u zcela vyvinuté žlázy mizí, u rodů *Bufo* a *Discoglossus* zůstávají zachovány a vykazují sekreční aktivitu. Od hlouběji uložených tkání jsou buňky cementové žlázy odděleny bazálními buňkami, vznikajícími ze spodní vrstvy ektodermu (Evercooren a Picard, 1978).

Sekreторické buňky vykazují typické charakteristiky buněk adhezivních orgánů. Jádra jsou umístěna bazálně a většinu cytoplasmy vyplňuje endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát (Nokhbatolfoghahai a Downie, 2005). V bazální části buněk lze místy nalézt shluky melaninových granulí, které chrání jádra před UV zářením v době, kdy larva tráví většinu

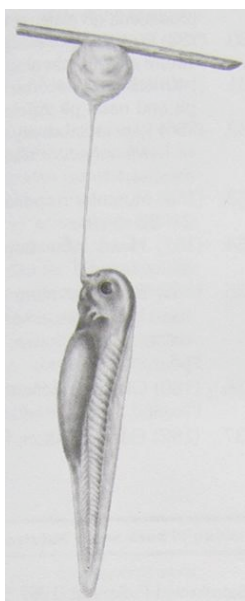


Obr. 8. Longitudinální řez cementovou žlázou *Xenopus laevis* pod světelným mikroskopem ($\times 400$). n, jádra; y, žloutková granula. Upraveno z Perry a Waddington (1966).

času přichycená k podkladu v blízkosti vodní hladiny (Pennati et al., 2000). Pod apikální membránou se pak hromadí sekreторické váčky s mukopolysacharidy (Picard, 1976; podle van Evercooren a Picard, 1978), avšak v rámci žlázy je možné nalézt i buňky bez váčků, což

naznačuje, že sekrece z buněk neprobíhá kontinuálně (Perry a Waddington, 1966). U plně rozvinuté žlázy drápatky se sekretorické buňky dělí na dvě populace, přičemž kraniální se vyznačuje nápadnějšími výběžky apikální membrány a celkově větší velikostí, z čehož Evercooren a Picard (1978) usuzují na vyšší sekretorickou aktivitu oproti buňkám kaudální části.

Inervaci cementové žlázy u *Xenopus laevis* se podrobně věnuje Roberts a Blight (1975). Nejvyšší hustota nervových zakončení je lokalizována v kaudálních partiích žlázy. Inervace je zajištěna větví trigeminálního nervu, pravděpodobně výběžky bipolárních buněk, které vstupují mezi sekretorické buňky a těsně pod povrchem jsou zakončeny zesíleným terminálním rozvětvením. Tato zakončení jsou schopna reagovat na kontakt se substrátem a zajišťují takzvanou „stopping response“. Ve chvíli, kdy se larva dotkne substrátu, zastaví se pohyby ocasu, aby se omezily



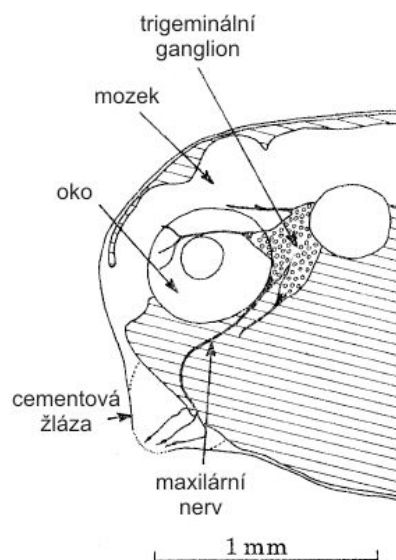
Obr. 10. Larva *Xenopus laevis* přichycená ke zbytku vajíčka pomocí sekretu cementové žlázy. Převzato z Duellman a Trueb (1986).

ztráty energie během doby, kterou stráví přichycená pomocí cementové žlázy.

Kromě toho jsou neurony excitovány také tahem,

vyvíjeným larvou visící na vlákně, tvořeném produkovaným sekretem. Visící larva setrvává v klidu a její reakce na ostatní podněty jsou nápadně utlumeny.

Předchozí odstavec napovídá leccos o funkci cementových žláz. Pomocí lepkavého sekretu se larvy ihned po vylíhnutí přichytí k substrátu, aby mohly dokončit vývoj orálního disku a ocasu, umožňujícího efektivnější pohyb (Altig a McDiarmid, 1999). Pro mnoho druhů slouží jako první substrát obaly vajíčka. Larvy druhu *Xenopus laevis* se přichycují ihned po vylíhnutí a z vylučovaného sekretu vytváří poměrně dlouhé vlákno, na kterém volně visí až do dokončení vývoje ocasu a úst. Po otevření úst začínají žlázy degenerovat (Groppelli et al., 2003).



Obr. 9. Schéma inervace cementové žlázy drápatky *Xenopus laevis*. Upraveno podle Roberts a Blight (1975).

Jak by se dalo očekávat, u druhů se zkráceným vývojem jsou cementové žlázy do značné míry redukovány. U druhů líhnoucích se v pozdějších stádiích mohou chybět nebo se objevit pouze krátkodobě (Duellman a Trueb, 1986; Budgett, 1899; Nokhbatolfoghahai a Downie, 2005) a zcela chybí také u žab s přímým vývojem, například u rodu *Eleutherodactylus* (Duellman a Trueb, 1986; Fang a Elinson, 1996; Nokhbatolfoghahai a Downie, 2005). Stejně tak mohou chybět u tzv. endotrofických druhů, tj. těch, jejichž larvy dosáhnou metamorfózy, aniž by přijímaly potravu z vnějšího prostředí (Thibaudeau a Altig, 1999).

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, názory na vztah k balancerům ocasatých obojživelníků se různí. Množství autorů citují Nokhbatolfoghahai a Downie (2005) a Pennati et al. (2000) při výčtu podobných struktur u pláštěnců, kostnatých ryb, případně ocasatých obojživelníků. Pennati et al. upozorňuje na možnost, že se adhezivní struktury uvedených skupin mohly zachovat jako pozůstatek ancestrálního stavu u těch linií, u kterých připadalo v úvahu využití jejich adhezivní funkce. Sive a Bradley (1996) si všímají morfologické podobnosti adhezivních papil sumek s cementovou žlázou drápatky *Xenopus laevis*. Obě tyto struktury se navíc nachází ventrálně od úst.

3.3 Adhezivní orgány třídy *Actinopterygii*

Paprsokoploutví (*Actinopterygii*) jsou další třídou nadtřídy ryb kostnatých (*Osteichthyes*). Pro přehlednost následující kapitoly bude pojednáno nejprve o cementových orgánech bazálních skupin, tedy řádů *Polypteriformes* (mnohoploutví, tedy bichři), *Acipenseriformes* (jeseteři, zahrnující dvě recentní čeledi *Acipenseridae* a *Polyodontidae*, jeseterovité a veslonosovité), *Amiiformes* (kaprouni) a *Lepisosteiformes* (kostlíni). Adhezivním orgánům nadřádu kostnatí (*Teleostei*), které jsou studovány častěji, je věnována druhá podkapitola.

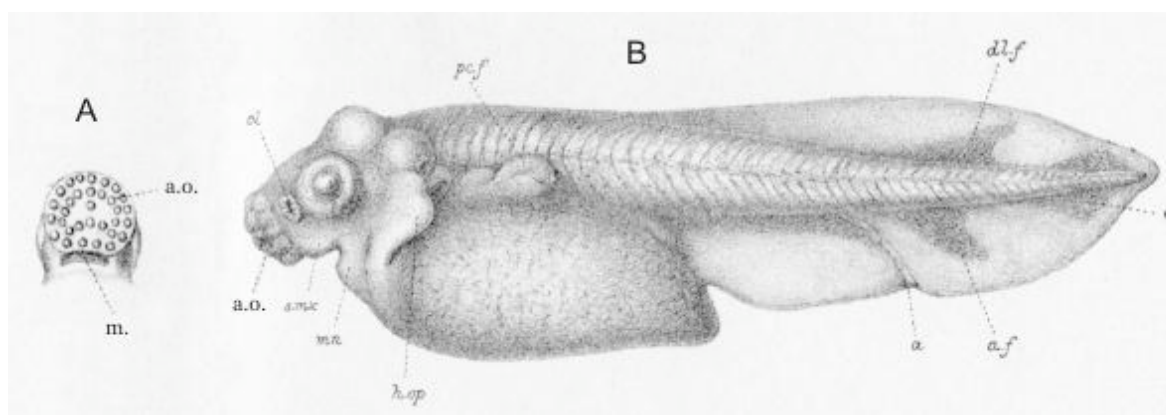
3.3.1 Cementové orgány bazálních skupin paprsokoploutvých

Jak bude ukázáno níže, zdá se vývoj a původ adhezivních orgánů u řádů *Polypteriformes*, *Acipenseriformes*, *Amiiformes* a *Lepisosteiformes* velmi zajímavý, a to především při následném porovnání s cementovými žlázami skupin nadřádu *Teleostei*. Přesto se tomuto tématu věnuje jen málo autorů a většina prací pochází z počátku 20. století. Proto budou všechny skupiny popsány pohromadě v jediné kapitole. Nejpodrobnější studie vývoje

cementových orgánů zpracoval Kerr (1907) u bichira *Polypterus senegalus* a dvojice Eyclesheymer a Wilson (1908) na kaprounovi *Amia calva*. Většina následujícího textu se tedy bude věnovat právě jim.

U obou zmiňovaných druhů, stejně jako u jesetera a kostlína, se adhezivní orgány zakládají na horní straně úst. U bichira mají podobu dvou kulovitých útvarů na spodní straně hlavy, nejprve směřujících do stran a později dolů. Výrazně vystupují nad ostatní povrch a jsou na hlavě embrya, spolu s vnějšími žábry, velice nápadné. Jakmile dojde k otevření úst, cementové orgány zůstávají na jejich horní straně a postupně se redukují (Kerr, 1907). Morfogeneze cementových orgánů bichira bude podrobně popsána v poslední části práce. Adhezivní orgány kaprouna *Amia calva* jsou taktéž párové a jsou rozděleny na šest až deset disků, uspořádaných do tvaru podkovy (Eyclesheymer a Wilson, 1908).

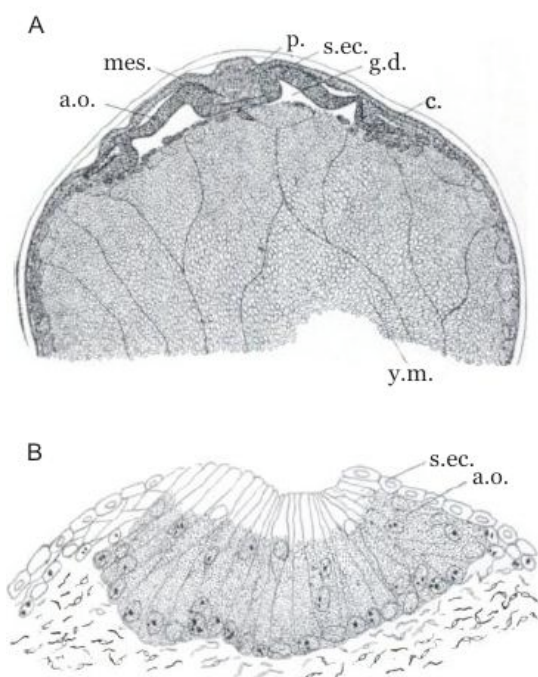
Adhezivní orgány byly u bazálních paprskoploutvých poprvé studovány u rodu *Lepisosteus* (Eyclesheymer a Wilson, 1908), byly však považovány za přísavné struktury fungující analogicky s ústy kruhoustých. Jsou opět tvořeny podkovovitým uskupením oddělených disků na přední části horní čelisti, které se s jejím prodlužováním a zužováním koncentrují a postupně redukují (Agassiz, 1878; podle Eyclesheymer a Wilson, 1908; Long a Ballard, 2001). Balfour a Parker (1882) dokládají sekreční funkci těchto struktur a soudí, že vznikají ze spodní vrstvy epidermis.



Obr. 11. *Lepisosteus osseus*. Ventrální pohled na hlavu embrya krátce před líhnutím (A) a larva krátce po vylíhnutí (B). m., ústa; a.o., adhezivní orgán. Upraveno podle Balfour a Parker (1882).

Adhezivními orgány jesetera se zabývá von Kupfer (1893; podle Eyclesheymer a Wilson, 1908). Vznikají původně jako nepárová struktura, která se však později rozdělí žlábkem v mediální linii. Každý z disků se pak podruhé dělí, čímž vznikají čtyři papily, ze kterých se podle von Kupfera vyvíjí smyslové vousy dospělých ryb. Podobné hmatové vousy

jsou známy také u veslonosa *Polyodon spathula* (Fox, 1999; Ballard a Needham, 1964), avšak jakékoli zmínky o adhezivních orgánech chybí.

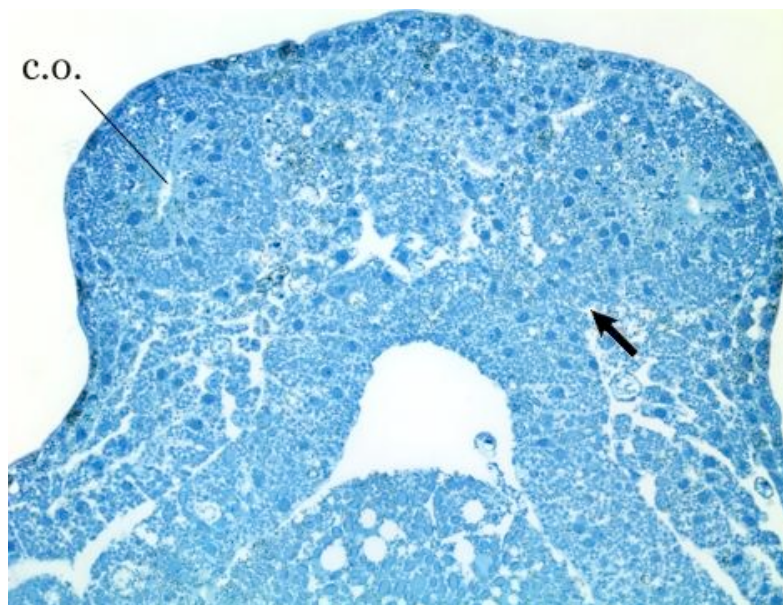


Obr. 12. Adhezivní orgány *Amia calva*. Tranzverzální řez embryem 52 hodin po oplození (A). Patrný je vznik adhezivních orgánů jako vychlípenin střeva. Detail adhezivního disku (B). s.ec., povrchový ektoderm; a.o., adhezivní orgán; y.m., žloutek; p., prosencephalon; g.d., vychlípení střeva; mes., mesoderm; c., coelom. Převzato z Eyclesheymer a Wilson (1908).

Jak Balfour a Parker (1882), tak Eyclesheymer a Wilson (1908) popisují typické protáhlé buňky s jádry situovanými v bazální části a cytoplasmou vyplněnou endoplasmatickým retikulem, které svou strukturou odpovídají sekretorickým buňkám adhezivních orgánů u jiných skupin. U kaprouna a bichira buňky obsahují také žloutková granula (Eyclesheymer a Wilson, 1908; Kerr, 1907). U těchto druhů je však popisována zásadní odlišnost v původu sekretorických buněk oproti ostatním skupinám. Obě práce shodně popisují vznik základů cementových orgánů jako vychlípenin přední části střeva, které se posléze odškrcují, putují k povrchu a otevírají se do vnějšího prostředí splnutím s epidermis, v případě bichira pohárkovitým ústím kulovitěho orgánu, u kaprouna jako do plochy rozvinutá žláza. Dle zmiňovaných autorů se tedy zdá, že původ sekretorických buněk je entodermální, čemuž nasvědčují i recentní data.

Funkce cementových orgánů je analogická s dříve popsány struktury. V době líhnutí jsou již zcela vyvinuté a funkční a umožňují adhezi larvy k podkladu. Larvy kostlína (*Lepisosteus*) se pevně přichycují ihned po vylíhnutí a odolávají poměrně silným pohybům vody (Agassiz, 1878; podle Balfour a Parker, 1882). Také u dalších druhů dochází záhy k přichycení a setrvání larev v klidu po několik dní (Eyclesheymer a Wilson, 1908). Jak bylo již naznačeno výše, další osud cementových orgánů se u jednotlivých skupin liší. U kaprouna *Amia calva* se jednotlivé disky adhezivního orgánu postupně zanořují pod epidermis, kde jsou buňky resorbovány (Eyclesheymer a Wilson, 1908). Také cementové orgány bichira mizí kompletně (Kerr, 1907). U jesetera však von Kupfer (1893; podle Eyclesheymer a Wilson, 1908) soudí, že ze čtyř adhezivních papil vznikají smyslové vousy. Dle Kuratani et al. (2000)

je tato oblast inervována větví páteho hlavového nervu, odpovídající u žab zmiňované ramus mandibularis nervi trigemini. Autor se však nevyjadřuje ke vztahu adhezivního orgánu se základy hmatových vousů. Pozůstatkem adhezivních orgánů u kostlína je dle Agassize (1878; podle Eyclesheymera a Wilson, 1908) měkké zakončení protažené horní čelisti.



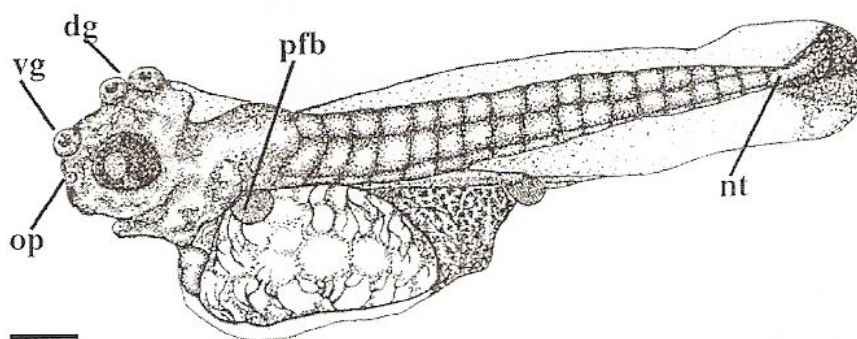
Obr. 13. Horizontální řez embryem bichira ve stádiu 24. Šipka naznačuje propojení vznikajícího levého cementového orgánu s entodermem. C.O., cementový orgán. Podle Martin Král'ovič, nepublikováno.

Při srovnání vývoje různých adhezivních struktur u skupin popisovaných v této práci je nápadná výjimečnost z entodermu se vyvíjejících orgánů bichira a kaprouna. Navíc i u nejbližší příbuzných skupin, kostlínů a jeseterů, jsou tyto struktury považovány za ektodermální (Balfour a Parker, 1882; von Kupfer, 1893; podle Eyclesheymera a Wilson, 1908), ačkoliv Phelps Allis (1926) uvádí, že jsou u obou skupin s adhezivními orgány kaprouna homologické. Eyclesheymera a Wilson dále soudí, že alespoň u jesetera je pro definitivní objasnění původu adhezivních orgánů nutný další výzkum. K otázce homologie s adhezivními strukturami ostatních skupin posledně zmiňovaní autoři uvádí, že vznik homologických struktur z rozdílných zárodečných vrstev se zdá nepravděpodobný. Tuto možnost však bude možné zamítnout až po zvážení všech úrovní, na kterých je homologie možná.

3.3.2 Cementové žlázy kostnatých (*Teleostei*)

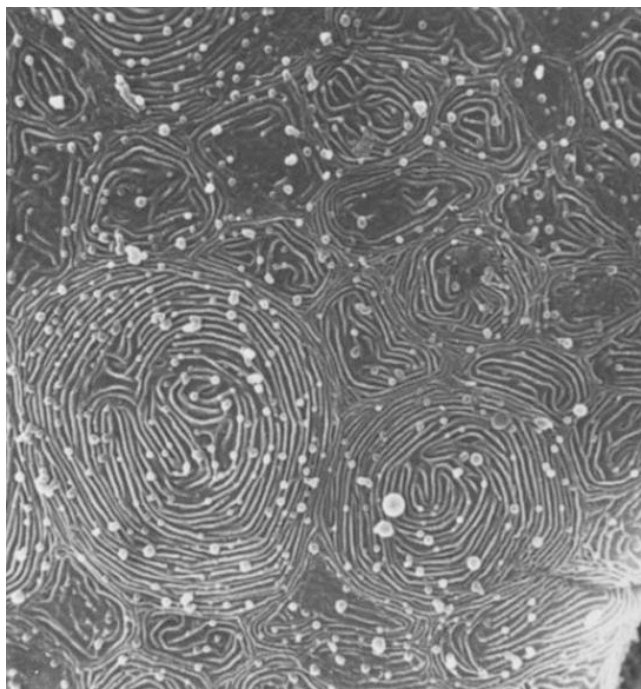
Kostnatí jsou nejdiverzifikovanější skupinou třídy *Actinopterygii*. Vzhledem k obrovskému množství druhů se jejich studiu věnuje také velké množství autorů. U řady skupin tak byly poměrně podrobně popsány také cementové žlázy. Tyto struktury nacházíme u řádů *Osteoglossiformes* (Kerr, 1907), *Cypriniformes*, *Characiformes*, *Gymnotiformes*, *Esociformes* (Braum et al., 1996; Britz et al., 2000), *Synbranchiformes* (Taylor, 1913),

Perciformes a *Tetraodontiformes* (Britz et al., 2000). Obecně se zdá, že jsou omezeny pouze na sladkovodní druhy, s výjimkou jediného druhu, *Pholidichthys leucotaenia* (*Perciformes*) (Wirtz, 1994; podle Britz et al., 2000).



Obr. 14. Larva *Pterophyllum scalare* 115 hodin po oplození. vg, ventrální žláza; dg, dorzální žláza; op, čichová jamka; pfb, základ prsní ploutve; nt, notochord. Převzato z Groppelli et al. (2003).

Jako příklad struktury cementových žláz poslouží zástupci řádu *Gymnotiformes*, kterým se ve své práci věnuje právě Britz et al. (2000), a *Perciformes*, konkrétně cichlidy (*Cichlidae*), které jsou studovány nejčastěji. Uvedené skupiny se značně liší morfologií těchto struktur. V řádu *Gymnotiformes* (nahohřbetí) Britz popisuje přichytné orgány druhů rodu *Apteronotus* a *Rhamphichthys*, u kterých chybí koncentrace adhezivních buněk do specializovaného orgánu. Namísto toho jsou rozmístěny volně mezi epiteliálními buňkami dorzální strany hlavy. U cichlidy *Pterophyllum scalare* naopak vznikají nápadné cementové orgány (Groppelli et al., 2003). Tvoří je celkem tři páry kráterovitých vyvýšenin, dva na dorzální a jeden, tzv. ventrální, na přední straně hlavy, přičemž sekreторickou aktivitu vykazují nejprve dorzální žlázy a až poté ventrální. Tento rozdíl v načasování nejspíše umožňuje larvám zachovat možnost adheze po delší dobu.



Obr. 15. Povrch epiteliálních buněk cementové žlázy *Pterophyllum scalare*. Ústí žlázy se nachází v pravém dolním rohu. SEM ($\times 2000$). Převzato z Bennemann a Pietzsch-Rohrschneider (1978).

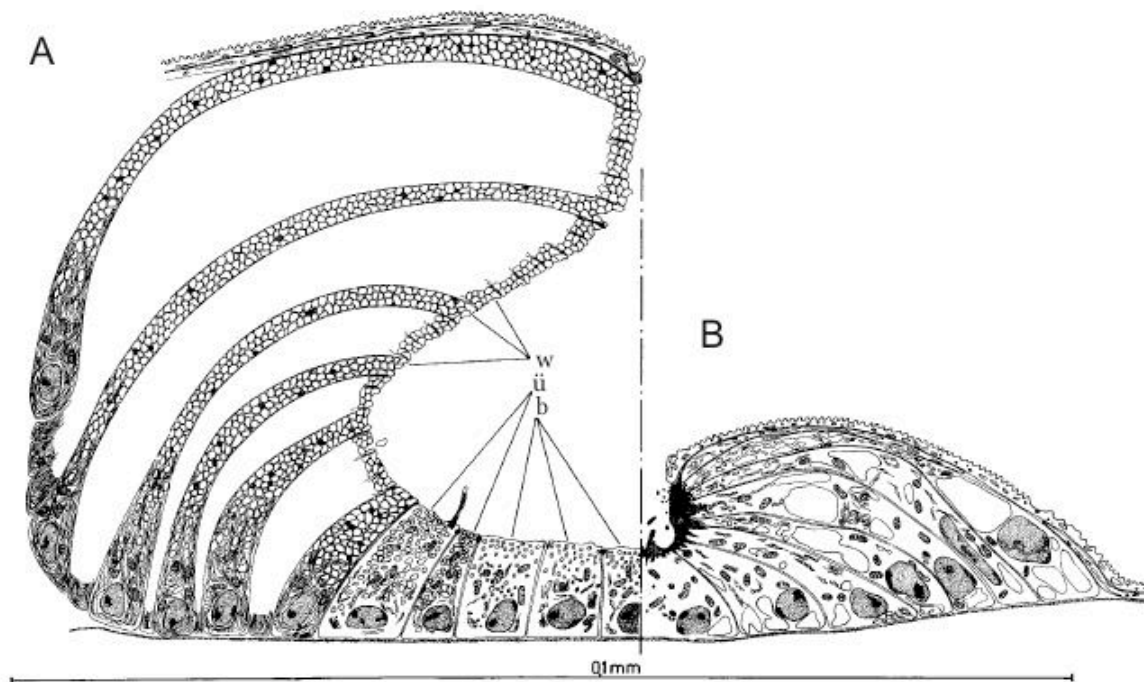
Základní charakteristiky buněk se u obou řádů shodují s těmi, uvedenými u ostatních skupin popisovaných v této práci (Bennemann

a Pietzsch-Rohrschneider, 1978). Jádra jsou v důsledku intenzivní sekretorické aktivity lokalizována bazálně, distálně se nachází systém rER a pod membránou buněk se shromažďují váčky připravené k exocytóze. U rodu *Apteronotus* jsou funkční součástí žlázy také epiteliální buňky, mezi kterými se nachází sekretorické buňky. Apikální části epiteliálních buněk jsou zakončeny zašpičatělými výběžky. Dopravu adhezivního sekretu k výběžkům zajišťuje zvrásněný povrch buněk, který je přítomný také u rodu *Rhamphichthys*, u kterého však chybí apikální výběžky. Vlastní sekretorické buňky dosahují povrchu těla pouze nejsvrchnější částí opatřenou microvilli. (Britz et al., 2000). Žlázy cichlid sestávají ze dvou typů sekretorických buněk (Arnold et al., 1968). První tvoří stěny orgánu a jsou nápadně protáhlé. Druhé jsou výrazně plošší a leží na bázi žlázy naproti jejímu vyústění. Oba typy vykazují sekretorickou aktivitu, avšak bazální buňky se liší přítomností nápadných výběžků cytoplasmy, ve kterých dochází k hromadění sekretorických váčků. Cementové orgány jsou pokryty dvojvrstevnou embryonální epidermis, jejíž buňky mají povrch zvrásněn podobně jako u druhů řádu *Gymnotiformes*. Sekretorické buňky pak mají původ ve spodní vrstvě ektodermu (Bennemann a Pietzsch-Rohrschneider, 1978). V souladu s výše popisovanými skupinami byla i u *Teleostei*, konkrétně u *Pterophyllum scalare* popsána inervace větví nervu trigeminu (Groppelli et al., 2003).

Funkce cementových žláz *Teleostei* se shoduje s ostatními skupinami obratlovců. Larvy se přichycují k substrátu ihned po vylíhnutí a setrvávají v klidu, dokud nezačnou samostatně přijímat potravu. Poté žlázy postupně mizí. Adheze zabrání larvu klesání do spodních, méně okysličených vrstev vody, případně usnadní setrvání na místě líhnutí u druhů s rodičovskou péčí. Naopak při útěku před predátorem může zůstat po určitý čas přichycená u dna (Britz et al., 2000). U řady druhů má vylučovaný sekret podobu vlákna, délkou srovnatelného s rozměry larvy (Kerr, 1907; Bennemann a Pietzsch-Rohrschneider, 1978), které je velmi pevné a odolává značně silným proudům vody. U cichlidy *Tilapia mariae* je toto vlákno produkováno bazálními buňkami cementového orgánu, zatímco lepkavý sekret dodávají periferní buňky (Arnold et al., 1968).

Jak bylo poznamenáno v úvodu předchozí kapitoly, cementové žlázy chybí u druhů, u kterých k líhnutí a vývoji larev dochází v tlamě rodiče. Larvy opouštějí bezpečí rodičových úst, jakmile jsou schopny volného pohybu (Groppelli et al., 2003), žlázy tohoto typu tedy nepotřebují. Například u druhu *Tilapia nilotica* nachází Arnold et al. (1968) rudimentární cementové žlázy, které sice produkují velmi malé množství adhezivních látek, avšak k jejich uvolňování z buněk zřejmě nedochází.

Otázkou vztahu cementových žláz *Teleostei*, konkrétně cichlidy *Pterophyllum scalare*, s podobnými strukturami sumek a žab se zabývá Groppelli et al. (2003). U všech skupin se jedná o dočasné, larvální orgány s identickou funkcí – umožnit larvě adhezi k substrátu. U studovaného druhu však orgán sestává ze tří párů žláz, ležících v porovnání s jinými typy adhezivních orgánů více posteriorně. Nicméně celé toto uskupení funguje jako jediný celek, umožňující adhezi během celého vývoje larvy. S napřimováním hlavové části se i ventrální žlázy dostávají do anteriorní pozice a zpoždění jejich aktivity prodlužuje dobu, po kterou je larva schopna adheze. Autoři tedy soudí, že morfologické a funkční odlišnosti od přichytných žláz sumek a žab jsou pouze zdánlivé a jsou důsledkem specializace orgánu a rozdělení sekreční aktivity v čase mezi jeho jednotlivé části. Britz et al. (2000) zmiňuje podobné orgány obojživelníků, dvojdyšných a bazálních paprskoploutvých ryb, avšak uvádí, že se nemusí jednat o homologické struktury. Dále se pak věnuje srovnání v rámci *Teleostei*, kde nachází rozmanité útvary, od jím popisovaných sekretorických buněk rozptýlených v epitelu až po komplexní orgány popisované u cichlid, a naznačuje možnost, že buňky těchto struktur mohly vzniknout specializací pohárkových buněk (goblet cells), přítomných v pokožce ostatních ryb.



Obr. 16. Schéma cementové žlázy *Tilapia mariae* (A) a rudimentární žlázy u *Tilapia nilotica* (B). w, periferní buňky; ü, přechodové buňky; b, bazální buňky. Převzato z Arnold et al. (1968).

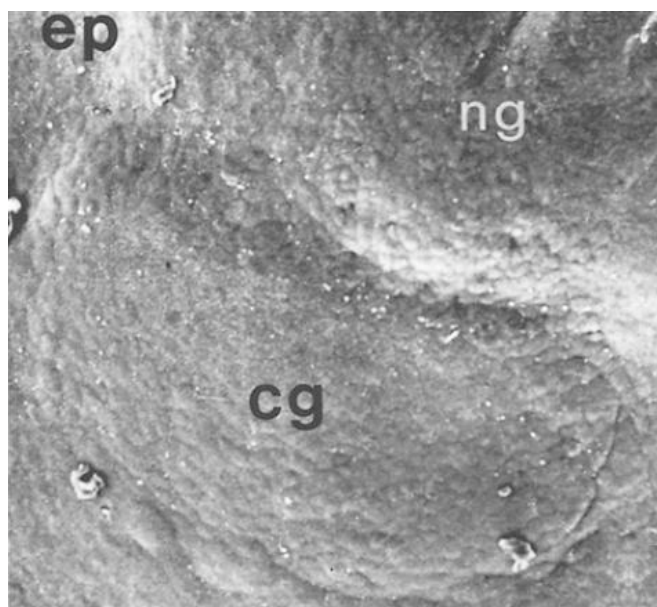
4. Morfogeneze přichytných žláz a orgánů

4.1 Morfogeneze cementové žlázy drápatky *Xenopus laevis*

Cementová žláza drápatky je zcela jistě nejprobádanější strukturou tohoto typu a poslouží tedy jako vhodná ukázka morfogeneze cementových orgánů, a také k nastínění indukce a genové regulace jejich vývoje. Jak bylo naznačeno v předchozí části práce, cementová žláza *Xenopus laevis* je typickým příkladem orgánů tohoto typu u obratlovců a bývá často homologizována s obdobnými strukturami paprskoploutvých, dvojdyšných nebo sumek (de Bernardi a Fascio, 1994; podle Sive a Bradley, 1996; Kerr, 1900; GropPELLI et al., 2003).

Morfologickým změnám během celého vývoje a degenerace žlázy se věnují van Evercooren a Picard (1978). Adhezivní orgán má jednoduchou strukturu tvořenou třemi hlavními buněčnými typy. Vlastní buňky žlázy (gland cells) jsou uloženy centrálně a jsou nápadně protáhlé. Laterální stěny žlázy tvoří tzv. okrajové buňky (bordering cells). Tyto dva typy mají svůj původ ve svrchní vrstvě ektodermu, zatímco bazální buňky, ohraničující bázi orgánu, vznikají ze spodní vrstvy ektodermu.

Ve stádiu 17 (dle Nieuwkoop a Faber, 1967) se základ žlázy objevuje jako tmavá ledvinovitá oblast anteriorně k nejpřednější části neurální ploténky. Od ostatního ektodermu se liší také četnějšími microvilli. Ve stádiu 19 a 20 je celá oblast lehce vyvýšená nad okolím a je v přímém kontaktu z oblastí mozku. Ve stádiu 24 už dosahuje charakteristického kuželovitého tvaru. Okrajové buňky se vyznačují četnými výběžky cytoplasmu a váčky. Ve stádiu 28 začíná žláza aktivně sekretovat. V tu dobu je již oddělena



Obr. 17. Oblast vznikající cementové žlázy ve stádiu 20 ($\times 300$). cg, cementová žláza; ep, epiblast; ng, přední okraj neurální ploténky. Převzato z Evercooren a Picard (1978).

od mozku invaginací stomodea. Ve stádiu 35 až 36 se povrch žlázy dělí na dvě diferenciované oblasti, větší, ledvinovitou kraniální část a kaudální část o něco méně vyvýšenou nad okolní

povrch. Buňky kraniální části vytváří výrazné cytoplasmatické výběžky, zatímco kaudální buňky jsou širší a ploché.

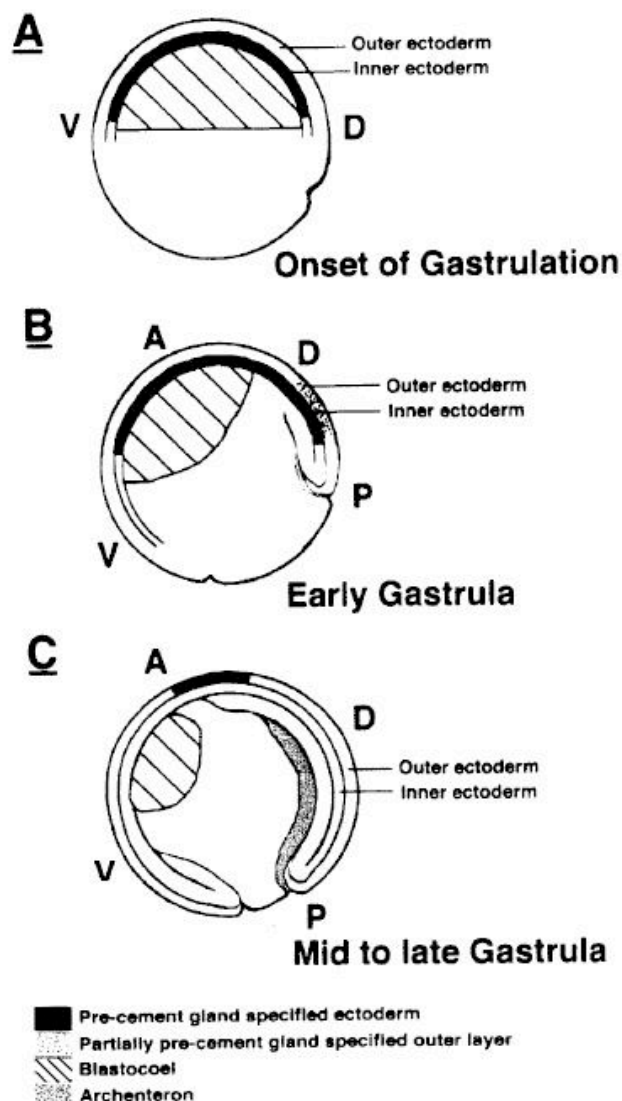
Ve stádiu 45 nastává proces involuce. Žláza vyčnívá výrazně nad okolní povrch, avšak sekreторické buňky se vzhledem k okrajovým buňkám začínají mírně zanořovat. Výběžky povrchu se zkracují a z okrajových buněk mizí sekreторické váčky. Počet obou typů buněk zřetelně klesá. Část buněk je zřejmě vytlačována ze žlázy na povrch a uvolňuje se do prostředí. Během stadia 49 se žláza stává stále plošší a záhy zcela zmizí. Není však známo, zda jsou buňky odstraňovány fagocytózou, nebo jsou integrovány do okolní epidermis (Evercooren a Picard, 1978). Vývojem žlázy se recentněji zabývají také Sive a Bradley (1996), kteří pozorují základ žlázy jako pigmentovaný proužek na počátku neurulace. S uzavřením neurální trubice se buňky prodlužují a adhezivní sekret začínají produkovat těsně před vylíhnutím embrya. Jestli k zániku žlázy dochází apoptózou nebo inkorporací do pokožky však zůstává nevyřešeno.

V sedmdesátých letech pracoval na zavedení cementové žlázy drápatky jako modelu pro studium diferenciacе embryonálních tkání J. J. Picard. Jeho výzkum se soustředil především na nalezení vhodných postupů indukce žlázy pomocí roztoku chloridu amonného (Picard, 1975a), přičemž buňky se ukázaly jako nejvnímavější ve stádiu rané gastruly (stádium 10). Postup byl aplikován se stejnými výsledky na dorzální i ventrální část ektodermu animálního pólu (Picard, 1975b) a potvrzen také pokusy na *Rana japonica* (Yoshizaki 1981). V současnosti je cementová žláza drápatky studována jako model diferenciacе anteriorní oblasti embrya, sdílející řadu kontrolních mechanismů s nervovou tkání, avšak v jednodušší podobě usnadňující jejich interpretaci (Bradley et al., 1996).

Další studie postupně vedly k odhalení komplexních mechanismů regulace, kterých se účastní celá řada sousedících oblastí v zárodečných vrstvách vyvíjejícího se embrya. Sive a Bradley (1996) poskytují přehled genů účastnících se diferenciacе cementové žlázy, často společně s indukcí nervové tkáně. Výlučně v cementové žláze je exprimován gen *Xcg*, jehož produktem je glykosylovaný, mucinu podobný protein. Spolu se žlázou umožňující narušení vaječných obalů (hatching gland) se cementová žláza vyznačuje také expresí *Xag*. Pouze v posteriorní části žlázy je pak exprimován gen *Xa*. Diferenciacе žlázy na dvě domény, alespoň co se týče exprese, je posíleno restrikcí homeotických genů třídy *distalless* (*Xdll3* a *Xdll4*) pouze na anteriorní část. Ta je selektivně inervována větvemi pátého hlavového nervu, rozdílná exprese v obou částech tak zřejmě napomáhá směřovat růst axonů (Sive a Bradley, 1996).

Cementovou žlázu lze *in vitro* indukovat v ektodermu animálního pólu nadměrnou expresí několika faktorů, mezi něž patří *noggin*, *chordin*, *folliculin*, *Xnr3* a geny rodiny *hedgehog*. *Noggin*, *folliculin* a *chordin* jsou exprimovány v notochordu, tedy v oblasti dorzálního mesodermu a mohou zřejmě difundovat do oblasti cementové žlázy. *Cephalic hedgehog* (*chh*) exprimovaný v anteriorní části nervové ploténky se na indukci zřejmě podílí také. Zmíněnými faktory jsou aktivovány geny, které přímo řídí diferenciaci orgánu, konkrétně homeotický gen *XOtx2*. Ten je exprimován i více posteriorně, v oblasti předního a středního mozku, přesná lokalizace cementové žlázy tedy podléhá dalším regulacím.

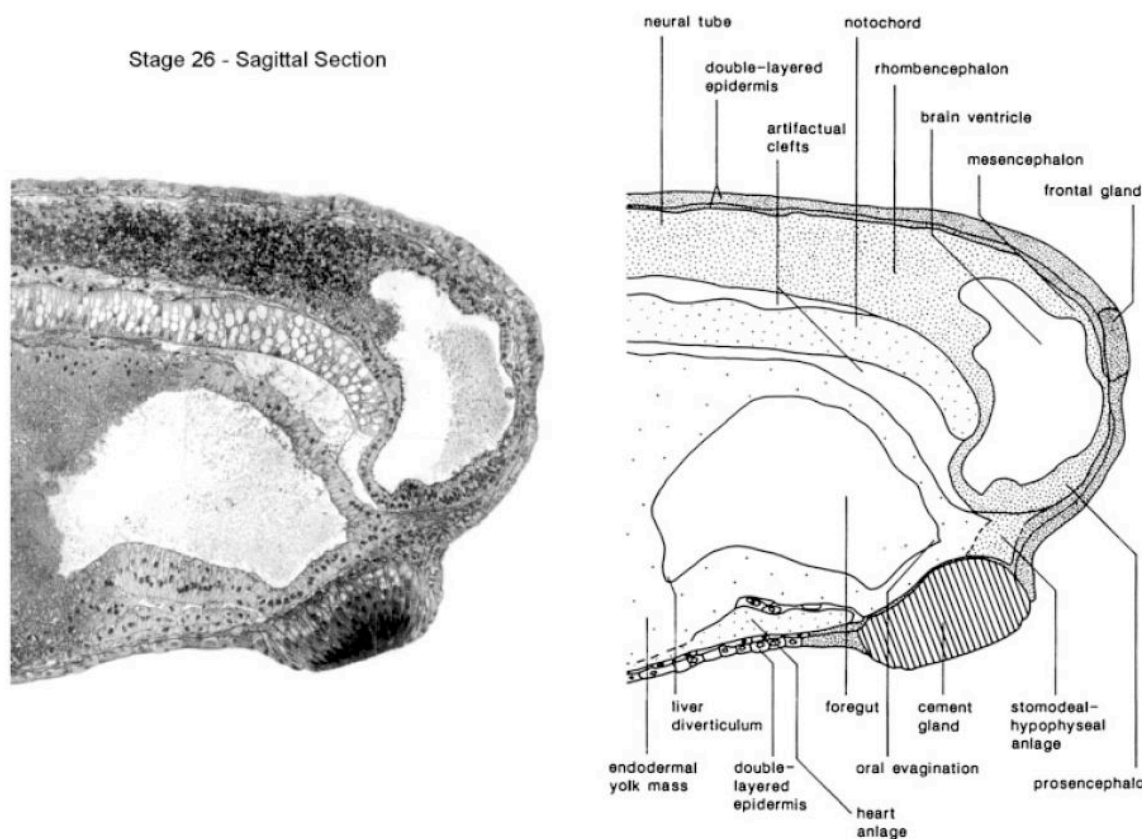
K inhibici vzniku žlázy ve ventrálním ektodermu přispívá výrazně *Xwnt8* a *bmp4*. Dalším významným inhibátorem je RA, která ve zvýšeném množství vede k transformaci anteriorního ektodermu na posteriorní. V posteriorním ektodermu a mesodermu exprimovaný eFGF může také zabránit vzniku cementové žlázy v těchto partiích. Faktorem, který zajišťuje odlišení od nervové tkáně regulací schopnosti buněk odpovídat na společné indukční signály, může být *XNotch1*, exprimovaný v cementové žláze. Sive a Bradley tedy ukazují, že vznik cementové žlázy nelze vysvětlit pomocí jednoduchého modelu. Nebyl nalezen žádný specifický faktor omezený na extrémně anteriorní oblast, ani specifická kombinace faktorů, které by se v této oblasti překrývaly. Odpovídající oblast zřejmě reaguje na sníženou koncentraci indukujících



Obr. 18. Průběh specifikace cementové žlázy *Xenopus laevis*. **A**, specifikace dorzální i ventrální části vnitřní vrstvy entodermu; **B**, Počátek specifikace vnější vrstvy; **C**, specifikace anteriorní dorzální části vnější vrstvy, vnitřní vrstva je přeprogramována na nervovou tkáň. V, ventrální; D, dorzální; A, anteriorní; P, posteriorní. Převzato ze Sive a Bradley (1996).

faktorů, které jinak při vyšších koncentracích zahájí diferenciaci na nervovou tkáň. Inhibice vzniku ektopických žláz není dosaženo jediným specifickým inhibitorem, ale celou řadou faktorů exprimovaných v různých oblastech embrya (Sive a Bradley, 1996).

Tíž autoři se v následující práci podrobně věnují úloze sousedících oblastí zúčastněných zárodečných vrstev a vlivu pozitivních a negativních signálů (Bradley et al., 1996). Žláza se zakládá v nejvíce anteriorní části embrya na rozhraní dorzálního a ventrálního ektodermu, konkrétně v jeho vnější, jednobuněčné vrstvě. Indukce je doložena ve stádiu pozdní gastruly expresí markerů *Xag* a *Xcg*. Ve stádiu časně neuruly se objevuje exprese genu *XA*. Indukované buňky se nachází nejprve v oblasti budoucí nervové ploténky, později už k expresi dochází v místě, kde vznikne samotná žláza. První specifikace základů cementové žlázy nastává již na počátku gastrulace, nicméně týká se pouze spodní vrstvy ektodermu, jejíž buňky se nakonec formování žlázy neúčastní.



Obr. 19. Sagitální řez larvou *Xenopus laevis* ve stádiu 26. Kresba ukazuje rozložení tkání, z nichž některé se podílí na indukcii cementové žlázy. Převzato z Wardle a Sive (2003).

Ke konci gastrulace se pod vrstvou buněk v oblasti vzniku žlázy nachází dorsoanteriorní entoderm, obsahující zásoby žloutku, který hraje významnou roli při indukcii cementové žlázy. Experimenty uvedených autorů ukazují, že schopnost indukce je omezena pouze na dorzální entoderm a zároveň pouze dorzální ektoderm je schopen na tuto indukci

odpovídat. Ventrální entoderm je současně schopen inhibovat vznik cementové žlázy v odpovídajících oblastech.

Bradley et al. (1996) soudí, že bezprostřední regulace vzniku žlázy je řízena interakcí dříve indukované spodní vrstvy ektodermu s vrstvou vnější, která je hlavním cílem indukce. Načasování této indukce do stádia střední gastruly je pak možným důsledkem pomalé difuze regulačních faktorů přes spodní vrstvu ektodermu. Formování nefunkční žlázy ve spodní vrstvě může být zabráněno inhibitory exprimovanými vrstvou ležící nad ní. Ve stádiu střední gastruly je nakonec spodní vrstva přeprogramována dorzálním mezodermem na nervovou tkáň. Jelikož indukční účinek entodermu má vliv pouze na dorzální ektoderm, je nutná přítomnost další oblasti, která činí budoucí základ cementové žlázy k těmto signálům citlivým. Jedná se zřejmě o notochord, jehož pozitivní vliv na vznik žlázy byl zmíněn výše. Přesná lokalizace a velikost žlázy je dále určena inhibičními signály ventrálního entodermu a mezodermu (Bradley et al., 1996).

Význam vzájemného ovlivňování jednotlivých oblastí byl ukázán při studiu induktivních interakcí během morfogeneze hlavových struktur *Eleutherodactylus coqui*, žáby s přímým vývojem, u které chybí typické struktury hlavy pulce a vytváří se přímo hlava podobná dospělému jedinci. Přestože při mezidruhových transplantacích mezi *Xenopus laevis* a *Eleutherodactylus coqui* embrya *E. coqui* vykazují schopnost indukovat v transplantátu cementovou žlázu, při opačném postupu není ektoderm tohoto druhu schopen reagovat na induktivní signály produkované embryem drápatky a cementová žláza nevzniká (Fang a Elinson, 1996). Rozdílná exprese faktorů ovlivňujících schopnost ektodermu reagovat na indukční signály okolních oblastí tak vede k přerušení signálů vedoucích k diferenciaci cementové žlázy.

Další práce upřesňují konkrétní mechanismy regulace a vzájemného ovlivňování genů, účastnících se indukce a lokalizace základu cementové žlázy drápatky. Ve středu zájmu je především úloha homeotického genu *XOtx2*, který je klíčovým regulačním genem v morfogenezi tohoto orgánu. Lunardi a Vignali (2006) porovnali aktivity *XOtx2* drápatky s homologickým genem *Otd* drosophily. Exprese tohoto genu v drápatce má stejné účinky jako *XOtx2*. Gamill a Sive (1997) se zabývali identifikací cílových genů podléhajících vlivu *XOtx2*. Prokázali, že tento gen alespoň částečně přímo řídí proces determinace budoucí cementové žlázy. K indukci je citlivá pouze oblast ventrolaterálního ektodermu na anteriorní části embrya, a to pouze ve stádiu střední gastruly, ačkoliv *XOtx2* je v dorzálním ektodermu exprimován již u rané gastruly. Během gastrulace je posteriorní ektoderm dočasně naprogramován jako anteriorní, pro správně probíhající morfogenezi je tedy zásadní, aby

neodpovídal na regulační faktory, dokud není opět určena anteriorní a posteriorní část. Vzniku cementové žlázy v neuroektodermu je bráněno buď specifickým inhibitorem, nebo absencí kofaktoru nutného k indukci.

Přímým cílem působení *XOtx2* je *Xcg*. Tyto dva geny jsou v základu žlázy exprimovány vždy pohromadě a exprese genu *Xcg* je regulována vazbou *XOtx2* na jeho promotor. Další marker cementové žlázy, *Xag*, je zřejmě regulován nepřímo. *XOtx2* se na počátku gastrulace hromadí v dorzálním ektodermu, avšak oblast budoucí cementové žlázy tou dobou není schopna reagovat. Ve stádiu střední gastruly, zřejmě ztrátou inhibitoru nebo syntézou kofaktoru, se tato oblast stává citlivou a reaguje expresí markerů cementové žlázy a endogenního *XOtx2*. Zároveň je nutná spoluúčast faktoru, omezujícího indukci na ventrálnější oblast (ventrolaterální ektoderm), ať už se jedná o ventrálně exprimovaný kofaktor, nebo dorzálně exprimovaný inhibitor (Gamill a Sive, 1997).

Autoři ve své další práci (Gamill a Sive, 2000) identifikují permisivní faktor zodpovědný za lokalizaci oblasti citlivé na *XOtx2*. Jedná se o *Bmp4*, exprimovaný ve ventrálních tkáních a inhibovaný faktory *noggin* a *chordin*, exprimovanými dorzálně. Při vysokých koncentracích *XOtx2 in vitro* dochází k inhibici exprese *Bmp4* a k vývoji nervové tkáně. Nižší koncentrace umožňují expresi *Bmp4* a indukují cementovou žlázu. V experimentech s koncentrací BMP4 při vyšších hodnotách dochází k inhibici nervové tkáně, při nízkých naopak k inhibici cementové žlázy. Diferenciace tohoto orgánu je tedy závislá na koexpresi studovaných faktorů. Při vyšší koncentraci jednoho je však vždy druhý inhibován. Tato skutečnost naznačuje nutnost složité regulace, do které jsou zapojeny faktory *noggin* a *chordin*. Oba aktivují *XOtx2* a při vyšších koncentracích inhibují *Bmp4*. Při středních hodnotách, kdy je stále aktivována exprese *XOtx2*, je však exprese *Bmp4* umožněna, čímž dochází k překryvu těchto faktorů. Alternativou k této hypotéze je exprese *XOtx2* i *Bmp4* v buňkách v takových koncentracích, ve kterých se vzájemně neinhibují (Gamill a Sive, 2000).

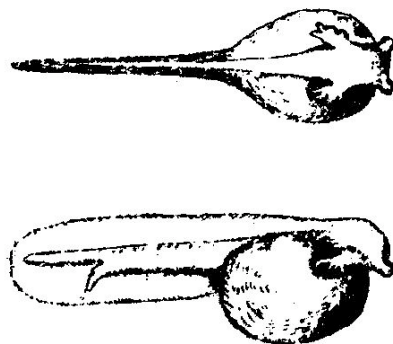
Detaily účinku *XOtx2* na *Xag* se zabývá Wardle et al. (2002). Dále definují několik domén, na jejichž překryvu se zakládá cementová žláza. Jedná se o průnik ventrolaterální a anterodorzální oblasti s vnější vrstvou ektodermu. Toto zjištění pak shrnují do jednoduchého schématu AD+VL+EO=CG (AD, anterodorzální doména; VL, ventrolaterální doména; EO, vnější vrstva ektodermu). Myšlenku lokalizace cementové žlázy překryvem těchto tří domén rozvádí dále Wardle a Sive (2003) jako alternativu k lokalizaci žlázy středními hodnotami exprese *Bmp4*. Anterodorzální doména je oblast, ze které se dále vyvíjí přední mozek a cementová žláza spolu s přilehlým mesodermem a entodermem, definovaná expresí *XOtx2*.

Ventrolaterální doménu charakterizuje exprese genů *Bmp4* a *Vent2*. Faktory determinující vnější vrstvu ektodermu nejsou stále s jistotou známy, nicméně je zřejmé, že vnější a vnitřní vrstva se v exprimovaných genech značně liší od stádia rané gastruly.

Dalším genem, který se uplatňuje při indukci cementové žlázy je *Otx5*, paralog *Otx2*. Přesný mechanismus jeho působení není znám, je však schopen indukovat cementovou žlázu in vitro. Tento gen (*PwOtx5*) byl studován na žebrovníkovi *Pleurodeles waltl*, u kterého se podílí na diferenciaci balancerů (Sauka-Spengler et al., 2002). Změny v expresi *PwOtx5* mohou být zodpovědné za druhotnou ztrátu balancerů u některých druhů. Expresi *Otx2* v balancerech žebrovníka však prokázána nebyla. Homologii s cementovými žlázami tedy s jistotou vyvozovat nelze (viz kapitulu 3.2.2), ale výsledky naznačují, že regulace vzniku obou struktur bude do jisté míry podobná (Sauka-Spengler et al., 2002). Pro posouzení homologie s obdobnými orgány dalších skupin obratlovců bude nutné blíže poznat mechanismy jejich regulace a geny, které se na ní podílí.

4.2 Morfogeneze cementových orgánů bichira *Polypterus senegalus*

Na konec tohoto textu jsem zařadil morfogenezi cementových orgánů bichira *Polypterus senegalus*, kterému se chci dále věnovat v diplomové práci. Díky své bazální pozici mezi paprskoploutvými jsou bichiři vhodným modelem pro studium evoluce *Actinopterygii* i *Sarcopterygii*. Přes veškerý zájem o ně však nebyla provedena žádná recentní studie, která by se detailně zabývala morfogenezi cementových žláz. Již v kapitole věnované bazálním skupinám paprskoploutvých ryb jsem zmínil, že tyto struktury u bichirů zřejmě vznikají z entodermu a odlišují se tak od srovnatelných orgánů všech ostatních skupin obratlovců, s výjimkou některých dalších bazálních *Actinopterygii*. Proto by bylo velice zajímavé pokusit se odpovědět na otázku, zda jsou homologické například s podrobně prostudovanými cementovými žlázami žab.

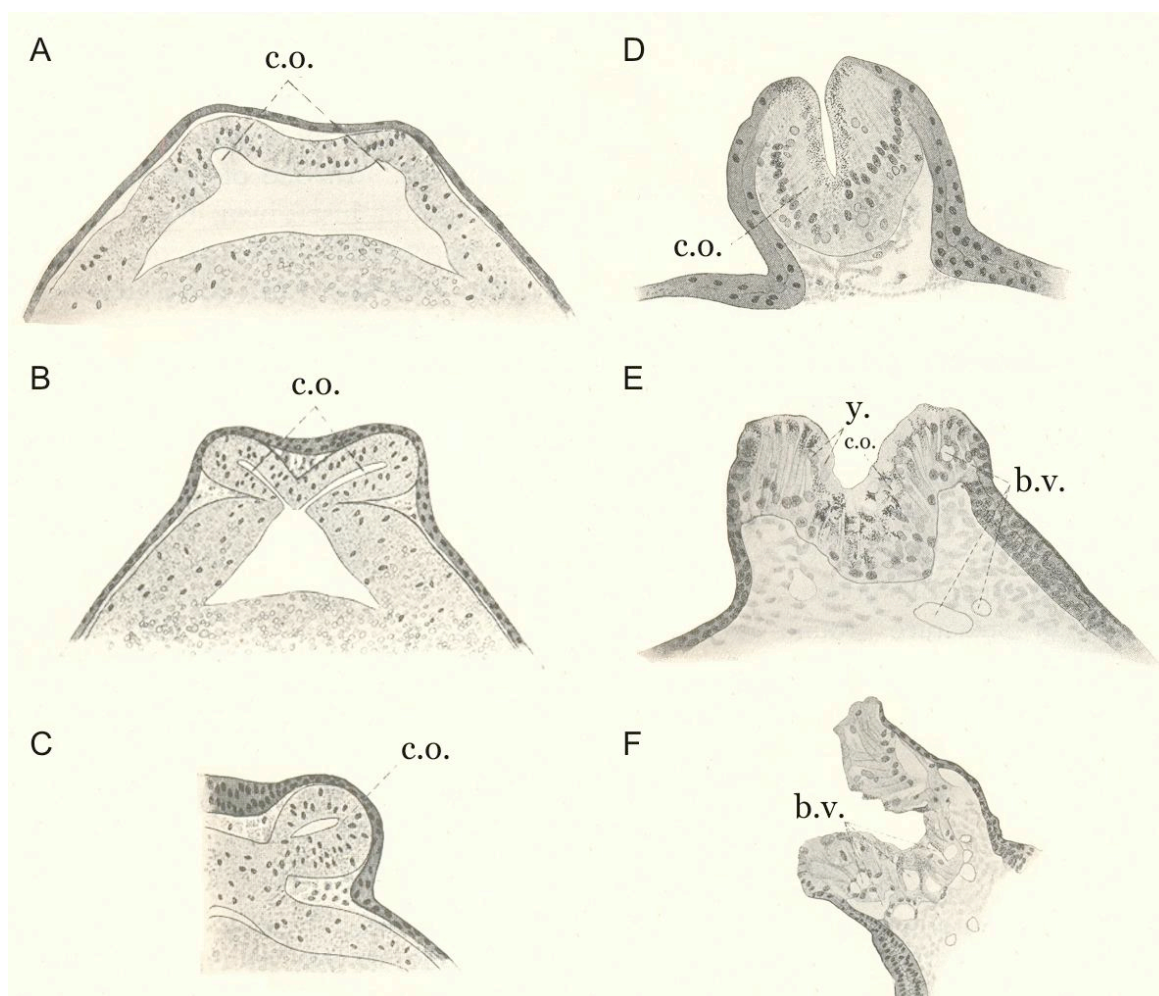


Obr. 20. Embryo bichira ve stádiu 28, dorzální a laterální pohled. Na přední straně hlavy jsou nápadné cementové orgány. Upraveno podle Budgett (z Kerr, 1907).

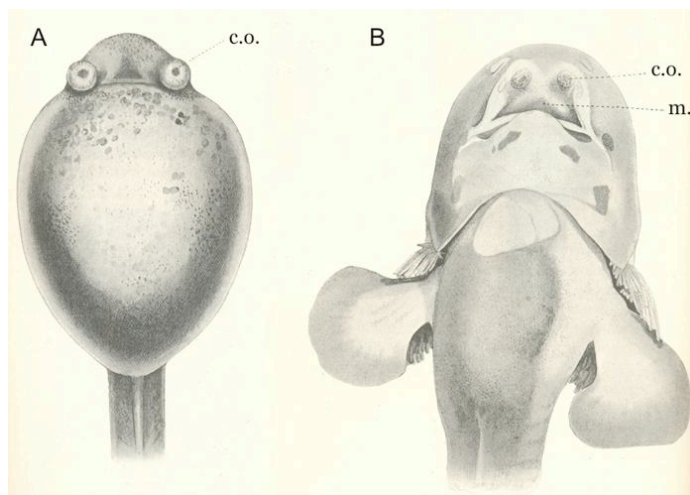
Na přelomu 19. a 20. století se bichiry zabýval J. S. Budgett. Na základě jeho materiálu přivezeného z expedic po Africe pak Kerr (1907) detailně popsal vývoj larev tohoto

druhu a to včetně morfogeneze cementových orgánů. Následující přehled, včetně uváděných stádií, vychází tedy z jeho práce.

Základy cementových orgánů se na horizontálních řezech embryem objevují ve stádiu 20 až 21, tedy po uzavření neurální trubice. Mají podobu kapsovitých vychlípenin svrchní strany prvostřeva, tlačících zevnitř na ektoderm a projevujících se navenek jako nenápadné vyvýšeniny. Buňky tvořících se orgánů obsahují četná žlutková granula, která jsou nápadná i během jejich dalšího vývoje a vstřebána jsou přibližně současně s ukončením sekreční aktivity buněk. V následujících stádiích se vychlípeniny zvětšují a rostou anteriorním směrem. Kolem stádia 24 jsou tyto výběžky stále napojeny na dutinu prvostřeva, avšak spojení se výrazně zužuje až na tenkou stopku vyplněnou buňkami. Ve stádiu 25 jsou již základy cementových žláz odděleny od prvostřeva vrstvou mezenchymu a mají podobu dutých váčků. Při pohledu na hlavu embrya se projevují jako nápadné cylindrické výběžky po stranách ventrální části hlavy. Ventrální stěna váčků postupně splývá s ektodermem.



Obr. 21. Vznik cementových orgánů u bichira. Horizontální řezy přední částí embrya ve stádiu 20 (A), 23 (B) a 24 (C) a řezy cementovým orgánem ve stádiu 26 (D), 31 (E) a 32 (F). c.o., cementový orgán; b.v., cévy; y., žlutková granula. Upraveno z Kerr (1907).



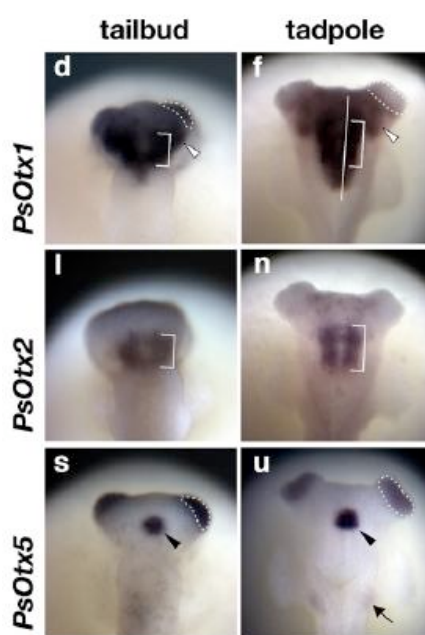
Obr. 22. Ventrální pohled na larvu bichira ve stádiu 30 (A) a 33 (B). c.o., cementový orgán; m., ústa. Převzato z Kerr (1907).

Ve stádiu 26 dochází k perforaci stěny, oddělující lumen váčku od vnějšího prostředí. Sekreторické buňky v oblasti ústí plynule navazují na spodní vrstvu ektodermu a vytváří tak dojem, že celý útvar vznikl invaginací právě této vrstvy. Při pohledu na celé embryo mají orgány pohárkovitou podobu a zaujímají ventrolaterální pozici na přední části hlavy. Svrchní vrstva ektodermu pokrývá

stěny orgánů a přerušena je až u jejich ústí. Žloutková granula se soustřeďují v bazálních částech buněk a orgány vykazují sekreторickou aktivitu během několika příštích stádií.

Kolem stádia 30 se cementové orgány posouvají více mediálně a ventrálně a ve stádiu 31 již jejich široká ústí směřují zcela ventrálně. Zásoby žloutku jsou již téměř spotřebovány a žlázy počínají degenerovat. Od následujícího stádia jsou postupně prorůstány cévami a degradovány. Pohárkovité útvary se začínají zmenšovat a stěny se ztenčují. Při ventrálním pohledu ve stádiu 32 se téměř dotýkají jeden druhého v mediální pozici na ventrální straně hlavy. V dalším stádiu dochází k otevření úst a cementové orgány se ocitají na jejich horním rtu. Ve stádiu 36 cementové orgány kompletně mizí jak z hlavy embrya, tak z histologických řezů. Závěrečná stádia jejich degradace však Kerr blíže nepopisuje kvůli nedostatku vhodného materiálu.

Kerr v následujícím textu nabízí tři možné interpretace vzniku těchto útvarů: 1.) mohou být homodynamické s žaberními štěrbinami (visceral clefts), 2.) mohou být homodynamické s coelomovými váčky, 3.) mohou být nezávisle vzniklými



Obr. 23. Expresy paralogů *Otx* v embryu bichira. Dorzální pohled na přední část. Hranaté závorky vyznačují střední mozek, černé šipky epifýzu, přerušovaná čára cementový orgán. Upraveno podle Suda et al. (2009).

orgány. Dle jeho názoru prvnímú vysvětlení nasvědčuje jejich vznik a anatomie, druhému spíše jejich fyziologie a sekrece cementové látky. Pokud jde o homologii s adhezivními orgány dalších skupin obratlovců, k zodpovězení této otázky bude třeba podrobněji prostudovat mechanismy vzniku cementových žláz u bichira. Jistý krok tímto směrem již učinili Suda et al. (2009), kteří identifikovali místa exprese paralogů genu *Otx* u tohoto druhu (*PsOtx*). *PsOtx2* je silně exprimován v oblasti středního mozku a o něco méně v cementových orgánech, *PsOtx5* pak výlučně v cementových orgánech a epifýze.

5. Závěr

Jak bylo ukázáno v předcházejících kapitolách, přichytné orgány různého typu jsou do jisté míry charakteristickým znakem primárně vodních larev všech hlavních skupin obratlovců, s výjimkou kruhoústých a paryb. Podobné struktury nacházíme také u kopinatců (*Acrania*) a sumek (*Ascidacea*). V případě, že u některé skupiny chybí, je tomu tak často ze zcela zřejmých příčin. Jako příklad lze uvést například latimérie, jež rodí živá mláďata, či obojživelníky s různě modifikovaným larválním vývojem, jako jsou některé žáby (Duellman a Trueb, 1986) nebo červoři. Typickými organismy spadajícími do této kategorie jsou také cichlidy, jejichž larvy se líhnou v tlamě rodiče (tzv. „mouth-brooders“; Groppe et al., 2003). Nakonec zcela samozřejmá je absence podobných struktur u zástupců blanatých (*Amniota*). Méně zřejmé jsou příčiny tohoto stavu u mořských ryb, u kterých byly cementové orgány popsány na jediném druhu (Wirtz, 1994; podle Britz et al., 2000). Jedná-li se však o skupiny, jejichž larvy žijí planktonním způsobem života, tato skutečnost opět nijak zvlášť nepřekvapí.

Nepříliš jasné jsou ovšem příčiny absence adhezivních struktur u kruhoústých a paryb. Alespoň tedy v případě, že budeme tyto struktury považovat za homologické s adhezivními papilami pláštěnců, přesněji sumek. V opačném případě se nabízí vysvětlení, že se orgány vyvinuly až u odvozenějších skupin obratlovců. Ostatně myšlenkou nezávislého vzniku těchto struktur se zabývají také někteří dříve citovaní autoři. Britz et al. (2000) upozorňuje, že cementové žlázy *Teleostei* mohly vzniknout specializací pohárkových buněk epidermis a podle Crawford a Wake (1998) jsou evoluční novinkou daného taxonu také balancery, vyvíjející se u odvozenějších čeledí ocasatých obojživelníků. Tomu by nasvědčovala také jejich absence u bazální skupiny *Sirenidae*, ačkoliv tato spadá způsobem rozmnožování do stejné ekologické kategorie jako druhy, u nichž jsou balancery vyvinuty (Crawford a Wake, 1998).

V rámci některých skupin vykazují přichytné žlázy značné rozdíly. Především uvnitř paprskoploutvých ryb nalézáme značnou rozmanitost co do morfologie i vývoje těchto orgánů. Zajímavý se zdá především poznatek některých autorů (Kerr, 1907; Eyclesheym a Wilson, 1908) zabývajících se larválním vývojem zástupců dvou bazálních skupin, kaprounů a bichirů, u kterých ukazují, že cementové orgány těchto druhů zřejmě vznikají z entodermu. Porovnání morfogeneze cementových orgánů těchto organismů s některou jinou skupinou, u níž se žlázy vyvíjejí z ektodermu, by proto bylo vhodným předpokladem pro posouzení možné homologie adhezivních struktur obratlovců obecně.

Buňky cementových orgánů napříč všemi sledovanými skupinami vykazují jisté společné znaky. Otázkou však zůstává, zda tato skutečnost odráží jejich společný evoluční původ, nebo je pouze důsledkem jejich specializované úlohy. Poslední úroveň, která by mohla přispět k odhalení vztahu mezi těmito orgány u různých skupin, je genová regulace jejich vzniku. Geny, odpovídající těm, jež se podílí na vzniku cementové žlázy drápatky *Xenopus laevis*, již byly popsány u žebrovníka *Pleurodeles waltl* (Sauka-Spengler et al., 2002). Suda et al. (2009) nedávno ukázali, že tyto geny mohou být zřejmě exprimovány v cementových žlázách také u jiných skupin.

V mé další práci se chystám podrobněji zabývat cementovými orgány bichira *Polypterus senegalus* a zaměřit se na detaily vývoje těchto struktur během embryogeneze. Následně bude vhodné porovnat zjištěné poznatky s dalšími organismy, z nichž jako nejvhodnější a nejsnáze dostupná se zdá drápatka *Xenopus laevis*. Zajímavé srovnání by mohlo poskytnout také studium jesetera (*Acipenser sp.*), případně jiného zástupce bazálních paprskoploutvých ryb. Jistě bude vhodné využít také některých známých markerů cementové žlázy, popsanych právě u drápatky. Dosavadní poznatky o přichytných žlázách a orgánech, shrnuté v této bakalářské práci, poslouží jako vhodný základ pro další studium tohoto tématu a následnou diplomovou práci.

6. Seznam použité literatury

6.1 Přímé citace

1. **Arnold, M., Kriesten, K. & Peters, H.M. 1968.** Die Haftorgane von Tilapia-Larven (Cichlidae, Teleostei). Histochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **91**, 248-260.
2. **Balfour, F.M. & Parker, W.N. 1882.** On the Structure and Development of Lepidosteus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **173**, 359-442.
3. **Ballard, W.W. & Needham, R.G. 1964.** Normal embryonic stages of Polyodon spathula (Walbaum). *J. Morphol.* **114**, 465-477.
4. **Bennemann, R. & Pietzsch-Rohrschneider, I. 1978.** The Morphology of the Cement Gland Apparatus of Larval Pterophyllum scalare Cuv. & Val. (Cichlidae, Teleostei). *Cell Tiss. Res.* **193**, 491-501.
5. **Boglione, C., Bronzi, P., Cataldi, E., Serra, S., Gagliardi, F., Cataudella S. 1999.** Aspects of early development in the Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. *J. Appl. Ichthyol.* **15**, 207-213.
6. **Bradley, L., Wainstock, D. & Sive, H. 1996.** Positive and negative signals modulate formation of the *Xenopus* cement gland. *Development* **122**, 2739-2750.
7. **Braum, E., Peters, N. & Stolz, M. 1996.** The adhesive organs of larval pike *Esox lucius* L., (Pisces). *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie* **81**, 101-108.
8. **Britz, R., Kirschbaum, F. & Heyd, A. 2000.** Observations on the structure of larval attachment organs in three species of gymnotiforms (Teleostei, Ostariophysi). *Acta Zool* **81**, 57-67.
9. **Brunelli, E., Perrotta, I., Bonacci, A., Tripepi, S. 2007.** The balancers of *Triturus italicus*: an ultrastructural approach. *Ital. J. Zool.* **74**, 135-142.
10. **Budgett, J.S. 1899.** Notes on the batrachians of the Paraguayan Chaco, with observations upon their breeding habits and development, especially with regard to *Phyllomedusa hypochondrialis*, Cope. Also a description of a new genus. *Q. J. Microsc. Sci.* **42**, 305-333.
11. **Budgett, J.S. 1901.** On the breeding-habits of some West-African Fishes, with an account of the external features in the development of *Protopterus annectens* and a description of the larva of *Polypterus lapradei*. In Kerr J. G. *The work of John Samuel Budgett, Balfour Student of the University of Cambridge: Being a Collection of His Zoological Papers, together with a Biographical Sketch by A. E. Shipley, F.R.S., and Contributions by Richard Assheton, Edward J. Bles, Edward T. Browne, J. Herbert Budgett and J. Graham Kerr.* (Cambridge University Press: 1907, pp120-142).
12. **Crawford, A.J. & Wake, D.B. 1998.** Phylogenetic and evolutionary perspectives on an enigmatic organ: the balancer of larval caudate amphibians. *Zool. Anz.* **101**, 107-123.
13. **Drysdale, T. & Elinson, R.P. 1993.** Inductive events in the patterning of the *Xenopus laevis* hatching and cement glands, two cell types which delimit head boundaries. *Dev. Biol.* **158**, 245-253.
14. **Duellman, W.E. & Trueb, L. 1984.** *Biology of Amphibians.* (London: The Johns Hopkins University Press).
15. **Eycleshymer, A.C. & Wilson, J.M. 1908.** The Adhesive Organs of *Amia*. *Biol. Bull.* **14**, 134-1481.
16. **Fang, H. & Elinson, R.P. 1996.** Patterns of Distal-less Gene Expression and Inductive Interactions in the Head of the Direct Developing Frog *Eleutherodactylus coqui*. *Developmental Biology* **179**, 160-172.
17. **Fox, H. 1985.** Balancer Fine Structure of the *Pleurodeles* Larva. *Acta Zool* **66**, 97-110.

18. **Fox, H. 1999.** Barbels and barbel-like tentacular structures in sub-mammalian vertebrates: a review. *Hydrobiologia* **403**, 153-193.
19. **Gamill, L.S. & Sive, H. 1997.** Identification of *otx2* target genes and restrictions in ectodermal competence during *Xenopus* cement gland formation. *Development* **124**, 471-481.
20. **Gamill, L. & Sive, H. 2000.** Coincidence of *otx2* and BMP4 signaling correlates with *Xenopus* cement gland formation. *Mech. Dev.* **92**, 217-226.
21. **Goodrich, E.S. 1909.** Part IX: Vertebrata Craniata (First fascicle: Cyclostomes and Fishes). In Lankester, R. *Treatise on Zoology*. (London: Adam and Charles Black).
22. **Groppelli, S., Pennati, R., Sotgia, C., de Bernardi, F. 2003.** Cement gland apparatus of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Teleostei, Cichlidae): functional morphology in comparison with adhesive organs of other Chordata. *Ital. J. Zool.* **70**, 133-139.
23. **Katz, M.J. 1983.** Comparative anatomy of the tunicate tadpole, *Ciona intestinalis*. *Biol. Bull.* **164**, 1-27.
24. **Kerr, J.G. 1900.** The External Features in the Development of *Lepidosiren paradoxa*, Fitz. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **192**, 299-330.
25. **Kerr, J.G. 1907.** The development of *Polypterus senegalus* Cuv. by J. Graham Kerr, University of Glasgow. In Kerr J. G. *The work of John Samuel Budgett, Balfour Student of the University of Cambridge: Being a Collection of His Zoological Papers, together with a Biographical Sketch by A. E. Shipley, F.R.S., and Contributions by Richard Assheton, Edward J. Bles, Edward T. Browne, J. Herbert Budgett and J. Graham Kerr.* (Cambridge: Cambridge University Press, pp195-290).
26. **Long, W. & Ballard, W. 2001.** Normal embryonic stages of the Longnose Gar, *Lepisosteus osseus*. *BMC Developmental Biology* **1**, 6.
27. **Lunardi, A. & Vignali, R. 2006.** *Xenopus* *Xotx2* and *Drosophila* *otd* share similar activities in anterior patterning of the frog embryo. *Dev. Genes Evol.* **216**, 511-521.
28. **Nieuwkoop, P.D. & Faber, J. 1967.** *Normal Table of Xenopus laevis*. (Amsterdam: North-Holland Publishing Company).
29. **Nokhbatolfoghahai, M. & Downie, J.R. 2005.** Larval Cement Gland of Frogs: Comparative Development and Morphology. *J. Morphol.* **263**, 270-283.
30. **Pennati, R., Bolzern, A. M., Groppelli, S., Sotgia, C., de Bernardi, F. 2000.** The adhesive organs of Anura: a histological and molecular study. *Ital. J. Zool.* **67**, 1-8.
31. **Perry, M.M. & Waddington, C.H. 1966.** The ultrastructure of the cement gland in *Xenopus laevis*. *J. Cell Sci.* **1**, 193-200.
32. **Phelps Allis, E.J. 1926.** On Certain Features of the Orbito-Ethmoidal Region in the Cyclostomata, Plagiostomi and Teleostomi. *J Anat.* **60**, 164-172.
33. **Picard, J.J. 1975a.** *Xenopus laevis* cement gland as an experimental model for embryonic differentiation: I. In vitro stimulation of differentiation by ammonium chloride. *J. Embryol. exp. Morph.* **33**, 957-967.
34. **Picard, J.J. 1975b.** *Xenopus laevis* cement gland as an experimental model for embryonic differentiation: II. The competence of embryonic cells. *J. Embryol. exp. Morph.* **33**, 969-978.
35. **Roberts, A. & Blight, A.R. 1975.** Anatomy, physiology and behavioural role of sensory nerve endings in the cement gland of embryonic *Xenopus*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 111-127.
36. **Roček, Z. 2002.** *Historie obratlovců – evolvece, fylogeneze, systém.* (Academia).
37. **Sauka-Spengler, T., Germot, A., Shi, D. L., Mazan, S., 2002.** Expression patterns of an *Otx2* and *Otx5* orthologue in the urodele *Pleurodeles waltl*: implications on the evolutionary relationships between the balancers and cement gland in amphibians. *Dev. Genes Evol.* **212**, 380-387.
38. **Shi, D. & Boucaut, J. 1995.** The chronological development of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* (Michah). *Int. J. Dev. Biol.* **39**, 427-441.

39. **Sive, H. & Bradley, L. A 1996.** Sticky problem: The *Xenopus* Cement Gland as a Paradigm for Anteroposterior Patterning. *Dev. Dyn.* **205**, 265-280.
40. **Sotgia, C., Fascio, U., Melone, G., de Bernardi, F. 1998.** Adhesive Papillae of *Phallusia mamillata* Larvae: Morphology and Innervation. *Zool. Sci.* **15**, 363-370.
41. **Stach, T. 2000.** Ultrastructural characterization of a rostral secretory gland present in larval *Branchiostoma lanceolatum*. *Annales des Sciences Naturelles* **21**, 19-25.
42. **Suda, Y., Kurokawa, D., Takeuchi, M., Kajikawa, E., Kuratani, S., Amemiya, C., Aizawa, S. 2009.** Evolution of *Otx* paralogue usages in early patterning of the vertebrate head. *Dev. Biol.* **325**, 282-295.
43. **Taylor, M. 1913.** The Development of *Symbranchus marmoratus*. *QJ Microsc. Sci.* **s2-59**, 1-51.
44. **Thibaudeau, G. & Altig, R. 1999.** Endotrophic Anurans: Development and Evolution. In McDiarmid, W., Altig, R. *Tadpoles: The biology of anuran larvae*. (Chicago and London: The University of Chicago Press, pp170-188).
45. **Tree of Life Web Project. 1995.** Sarcopterygii. The lobe-finned fishes & terrestrial vertebrates. Version 01 January 1995 (temporary). <http://tolweb.org/Sarcopterygii/14922/1995.01.01> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
46. **van Evercooren, A. & Picard, J.J. 1978.** Surface Changes During Development and Involution of the Cement Gland of *Xenopus laevis*. *Cell Tiss. Res.* **194**, 303-313.
47. **Wardle, F.C. & Sive, H.L. 2003.** What's your position? The *Xenopus* cement gland as a paradigm of regional specification. *Bioessays* **25**, 717-726.
48. **Wardle, F.C., Wainstock, D.H. & Sive, H.L. 2002.** Cement gland-specific activation of the *Xag1* promoter is regulated by co-operation of putative Ets and ATF/CREB transcription factors. *Development* **129**, 4387-4397.
49. **Webb, J.E. 1969.** On the feeding and behaviour of the larva of *Branchiostoma lanceolatum*. *Mar. Biol.* **3**, 58-72.
50. **Yoshizaki, N. 1981.** Ionic induction of the frog cement-gland cell from presumptive ectodermal tissues. *J. Embryol. exp. Morph.* **61**, 249-258.
51. **Zwach, I. 1990.** *Naši obojživelníci a plazi ve fotografii*. (Praha: Státní zemědělské nakladatelství).

6.2 Nepřímé citace

1. **Agassiz, A. 1878.** The development of *Lepidosteus*. *Proc. Am. Acad. Arts and Sc. Boston* **13**, 65-76. Citováno podle Eyclesheyma a Wilson (1908).
2. **Burighel, P., Cloney, R. 1997.** Urochordata: Ascidiacea. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates Vol. 15*. (Wiley-Liss: 1997). Citováno podle Sotgia et al. (1998).
3. **de Bernardi, F. & Fascio, U. 1994.** Possibile omologia tra gli organi adesivi di ascidie e di anfibi. *Ist. Lomb. Rend. Sc. B.* **128**, 441-449. Citováno podle Sive a Bradley (1996).
4. **Frankenberger, Z. 1927.** Über die morphologische Bedeutung der Haftorgane bei den Larven einiger niederer Vertebraten. *Zool. Anz.* **69**, 171-180. Citováno podle Stach (2000).
5. **Lieberkind, I. 1937.** Vergleichende Studien über die Morphologie und Histogenese der larvalen Haftorgane bei den Amphibien. *C. A. Reitzels, Copenhagen*. Citováno podle Crawford a Wake (1998).
6. **Noble, G.K. 1931.** *The Biology of the Amphibia*. (Dover NY: 1931, p23). Citováno podle Crawford a Wake (1998).
7. **Picard, J.J. 1976.** Ultrastructure of the cement gland of *Xenopus laevis*. *J. Morphol.* **148**, 193-208. Citováno podle van Evercooren a Picard (1978).

8. **Stokes, M.D. 1997.** Larval locomotion of the lancelet *Branchiostoma floridae*. *J. Exp. Biol.* **200**, 1661-1680. Citováno podle Stach (2000).
9. **van Wijhe, J.W. 1926.** On the temporary presence of the primary mouth-opening in the larva of *Amphioxus*, and the occurrence of three postoral papillae, which are probably homologous with those of the larva of ascidians. *Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam, Proceedings (Science Section)* **29**, 286-295. Citováno podle Stach (2000).
10. **von Kupfer, C. 1893.** Studien zur vergleichenden Entwicklungsgeschichte des Kopfes. Heft 1. Die Entwicklung des Kopfes von *Acipenser Sturio*. *München*. Citováno podle Eyclesheymer a Wilson (1908).
11. **Wirtz, P. 1994.** Does the larva of *Pholidichthys leucotaenia* give a clue to the systematic position of the monotypic fish family Pholidichthyidae? In Schröder, J.H., Bauer, J., Scharl, J. *Trends in Ichthyology - an International Perspective* (Blackwell Science Ltd., Oxford: 1994, pp237-238). Citováno podle Britz et al. (2000).