

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybnářství a ochrany vod
Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický

Bakalářská práce

Lokalizace Balbianiho cytoplasmy jako prekurzora primordiálních gonocytů u jiker jesetera během oplození

Autor: Dvořák Matěj

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Martin Pšenička, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.

Studijní program a obor: B4103 Zootechnika, Rybnářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2011

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiát.

V Českých Budějovicích 6. 5. 2011

Dvořák Matěj

.....

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Martinovi Pšeničkovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Vojtěchovi Kašparovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a cenné připomínky při vypracování této práce. Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové Agentury České Republiky, project číslo P502/10/P426.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Matěj DVORÁK**
Osobní číslo: **V09B005P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Lokalizace Balbianiho cytoplasmy jako prekurzora primordiálních gonocytů u jiker jesetera během oplození**
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Oocyty mnoha organismů, včetně ryb obsahují tzv. zárodečnou plasmu, což je maternálně děděný determinant zárodečných buněk. Nedávno byla zárodečná plazma v útvaru Balbianiho cytoplasmy previtelogenních oocytů popsána také u jesetera. Ta obsahuje prekurzory zárodečných granulí tzv. nuage. Zárodečné granule se během embryonálního vývoje objevují jako součást primordiálních gonocytů (PGC) a podle některých studií hrají roli při jejich vzniku. PGC jsou embryonální buňky, ze kterých se v průběhu ontogenese diferencují gamety s potenciálem přenášet genetickou informaci do dalších generací. PGC nebo později spermatogonie mohou být tedy hodnotné pro genové banky a kryoprezervaci, především prostřednictvím produkce gamet získaných chimerizací zárodečných linií.

Prvním krokem pro úspěšnou transplantaci PGC je jejich vizualizace. Ta se provádí injikací GFP (green fluorescent protein) mRNA konjugovaného s mRNA specifickou pro buňky zárodečné linie, tak jako vasa nebo nanos, do oblasti lokalizace prekurzorů PGC co nejdříve po fertilizaci jikry.

Cílem této studie bude lokalizace Balbianiho cytoplasmy jako prekurzora PGC u jiker jesetera v průběhu oplození.

Gamety jeseterů budou získávány Genetickým rybářským centru FROV klasickou metodou podle Gely a kol. (2008). Hlavním nástrojem této práce bude elektronová mikroskopie. Tyto práce budou probíhat v laboratoři elektronové mikroskopie Biologického centra.

Rozsah grafických prací: 3 - 15 obrázků
Rozsah pracovní zprávy: 20 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Alavi, S.M.H., Cosson, J., Coward, K., Rafiee, R., 2008. Fish Spermatology. Alpha Science Ltd, Oxford, UK.
Cherr, G.N., Clark, W.H., 1985. Gamete interaction in the white sturgeon *Acipenser transmontanus*: a morphological and physiological review. Environ. Biol. Fishes. 14, 11-22.
Debus, L. Winkler, M. and Billard, R. 2008. Ultrastructure of the oocyte envelopes of some Eurasian acipenserids. Journal of Applied Ichthyology 24, 57 - 64.
Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I., 1993. Sturgeon Fishes. Developmental Biology and Aquaculture. Springer-Verlag, Berlin.
Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice metodik VÚRH JU, Vodňany 78, 1-24.
Psenicka M, Rodina M, Linhart O 2010. Ultrastructural study on fertilization process in sturgeon (*Acipenser*), function of acrosome and prevention of polyspermy. Animal Reproduction Science 117, 147-154.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Martin Pšenička, Ph.D.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Konzultant bakalářské práce: Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický
Datum zadání bakalářské práce: 30. listopadu 2009
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2011


prof. Ing. Otomar Lábahart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zapsaná v
389 25 Vodňany (2)


doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.
ředitel

Ve Vodňanech dne 14. ledna 2010

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
2.1. Trend výzkumu reprodukce jeseterů	8
2.2. Obecná charakteristika gonád a gamet jeseterů	9
2.2.1. Popis a struktura jiker	10
2.2.1.1. Obaly jikry	11
2.2.1.2. Alveolární granule	13
2.2.1.3. Vnitřní prostor jikry.....	14
2.3. Produkce chimér zárodečné linie	14
2.3.1. Sterilizace hosta určeného k produkci zárodečné chiméry	15
2.3.2. Využití chimér zárodečné linie	16
2.3.3. Vznik a význam PGC	17
2.3.4. Vizualizace PGC a příprava jikry k injikaci GFP	19
3. MATERIÁL A METODIKA	20
3.1. Získání gamet a jejich zpracování.....	20
3.2. Příprava preparátu pro transmisní elektronovou mikroskopii.....	20
3.2.1. Chemická fixace vzorku	21
3.2.2. Dehydratace vzorku.....	21
3.2.3. Zalévání vzorku	22
3.2.4. Příprava a manipulace s ultratenkými řezy	23
3.2.5. Kontrastování ultratenkých řezů	25

3.3. Pozorování a zpracování získaných snímků	26
4. VÝSLEDKY	26
5. DISKUZE A ZÁVĚR	28
6. LITERATURA.....	29
7. ABSTRAKT	36
8. ABSTRACT	37

1. ÚVOD

Pro veliký zájem o jesetery *Acipenseriformes* s cílem jejich reintrodukce a akvakulturního chovu je v popředí zájmu vyvinout co nejefektivnější systém produkce těchto druhů ryb. Genetická a cytogenetická manipulace s jesetery je velice obtížná, ale techniky biotechnologie a mikromanipulace se zárodečnými buňkami a embryi se můžou stát vhodným nástrojem zefektivňující chov jeseterovitých ryb.

Transplantace primordiálních gonocytů (PGC) je jednou z nejpoužívanějších biotechnologií pro tvorbu chimér zárodečných linií (germ-line chimera). PGC je embryonální kmenová buňka specializovaná pro tvorbu gamet (spermii a vajíček). Ta se po transplantaci do embrya stejného nebo příbuzného druhu ryby začlení do gonád hosta, které pak v dospělosti produkují gamety donora, transplantovaného jedince. Tato technika je prostudovaná zatím jen u modelových druhů ryb, ovšem její aplikací bychom mohli docílit např. efektivnější kryoprezervaci rybích druhů nebo zkrácení generačního intervalu u dlouho dozrávajících ryb, jakými jsou například i jeseteři.

Prvním a hlavním požadavkem pro zvládnutí techniky transplantace u jeseterů je zvládnutí metodiky značení PGC. To se u většiny druhů modelových ryb provádí injikací fluorescentu GFP (green fluorescent protein) konjugovaný s *nos1* 3'UTR mRNA do jikry brzy po oplození. Tato aplikace se musí provádět do míst lokalizace prekursoru PGC, kterým je u jeseterů tzv. Babiani cytoplasma obsahující „nuage“, která doposud nebyla u oplozené jikry jeseterů lokalizována. Dalším problémem injikace jeseteřích jiker je rezistence obalů k penetraci fluorescentu injikující kapiláry.

Cílem této studie je (a) popsání ultrastruktury jikry jesetera sibiřského *Acipenser baerii* před a po oplození a před a po aktivaci vodou; (b) prokázání přítomnosti nuage,

prekurzora zárodečných granulí PGC, jejich lokalizace a popis ultrastruktury ve fázi fertilizace pomocí elektronové mikroskopie.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Trend výzkumu reprodukce jeseterů

Jeseteři patří do nadřádu chrupavčitých ryb *Chondrostei*, který se dělí do dvou čeledí veslonosovití *Polyontidae* a jeseterovití *Acipenseridae*.

Početnost a velikost volně žijící populací těchto ryb jsou znepokojivé a podle Červené knihy jsou jeseteři nejvíce ohroženou skupinou druhů. Z 32 druhů chrupavčitých ryb můžeme najít 27 druhů v seznamu Červené knihy, přičemž 16 s označením kriticky ohrožený. Chov jeseterů přináší mnohé problémy: většina chovaných druhů jeseterů je ohrožena, výtěžnost masa je spíše nízká a v porovnání s ostatními druhy ryb dochází k pozdnímu pohlavnímu dospívání a opětovnému termínu zralosti gamet. Nicméně i přes tyto potenciálně negativní aspekty má chov jesetera slibnou budoucnost převážně v reintrodukci, produkci kaviáru a dekorativních ryb.

Počáteční studie chovu jeseterů byly provedeny již v polovině 19. století, kdy byli pokusní jedinci odlovováni z volně žijících populací. První málo úspěšné pokusy o reprodukci a následný odchov v Evropě a Severní Americe jsou datovány z let 1880 až 1920 (Gela a kol., 2008). Jako první zemí s úspěšnou reprodukcí jesetera kolem roku 1930, je považován Sovětský svaz (Doroshov a Binkowski, 1985). Mimo území bývalého SSSR je datován první úspěšný výtěr u jesetera bílého *A. transmontanus* k roku 1979 na Kalifornské univerzitě v USA (Hung, 1991). Při prvních umělých výtěrech se ryby odlovovaly na trdlišcích a jikernačky usmrcovaly. S postupem času bylo vyzkoušeno několik metod šetrnějšího umělého výtěru. Před klasickou metodou výtěru, která je z důsledku anatomie gonád jeseterů velmi zdoluhavá se upřednostnila metoda tzv. císařského řezu. Odběr ovulovaných jiker byl proveden otevřením dutiny břišní invazivním ventrálním řezem a opětovným zašitím řezu. Dnes je tato metoda na ústupu a v současnosti je nepreferovanější metoda miniinvazivního chirurgické proříznutí vejcovodu, kdy jsou jikry z ryb vytlačovány přes dutinu břišní.

S vývojem umělého výtěru jikernaček bylo v provozní praxi rozšířeno několik metod inseminace těchto ryb. Nejúspěšnější a dnes používanou metodu se stala metoda

oplození naředěným spermatem vodou, která předchází nechtěné polyspermii (z důvodu většího počtu mikropylí) (Gela a kol., 2008).

Výzkum a zefektivnění metodik reprodukce těchto ryb je v popředí zájmu. Srovnáním stávajících údajů jednak zdůrazní skutečnosti odlišných mechanismů při reprodukci jednotlivých druhů ryb, ale může objasnit překážky při umělé reprodukci ryb a optimalizovat tak stávající metodické instrukce. Při zajišťování uspokojivé reprodukce přinášejí nové metody řadu problémů a jejich správná diagnostika vychází ze znalosti anatomie a vlastností gamet ryb.

Nedávné poznatky z oblasti použití elektronové mikroskopie, které nám poskytly informace o jednotlivých pochodech při fertilizaci vytvořily nový náhled k řešení problémů reprodukce těchto ryb a otevřely nové možnosti ve vývoji metody mikromanipulace se zárodečnými buňkami, která může významně pomoci při posílení či obnově vymírajících či již vymřelých druhů kryokonzervací zárodečných buněk.

2.2. Obecná charakteristika gonád a gamet jeseterovitých

Vývoj jeseterovitých je velmi pomalý (Dettlaff a kol., 1993). Jak je známo jeseteři jsou diferencovaní gonochoristé (nerozlišené gonády jsou přímo diferencovány v testes nebo ovária), ale vzácně se můžeme setkat i s intersexními jedinci, kdy oba typy gonád koexistují témuž jedinci (Van Eenennaam a Doroshov, 1998). K pohlavní diferenciaci dochází pozdě, mezi 6 měsícem až 5 lety, podle druhu, geografických faktorů a faktorů životního prostředí (Akhundov, 1988). Navíc jsou jeseteři známí dlouhým intervalem opětovné zralosti gamet. Sexuální dospělosti je dosaženo ve věku 8-10 (nebo více) let, a to jak u divoce žijících ryb tak i v umělých chovech na rybích farmách (Van Eenennaam a Doroshov, 1998; Omoto a kol., 2001). Pro přehled jeseter malý *A. ruthenus* dosahuje první zralosti ve 3-7 letech u mlíčáka a u jikernačky ve věku 7- 9 let. Vyza velká *Huso huso* v případě mlíčáka dosahuje zralosti ve 12-14 letech a samice až v 16-18 letech (Rochard a kol., 1991).

Gametogeneze a gonádový cyklus byly již zkoumány a popsány u: *Acipenser baerii* (Akimova a kol., 1979; Williot a kol., 1991); bestěra, kříženec mezi samicí *Huso huso* a samcem *A. ruthenus* (Mojazi Amiri a kol., 1996a, b; Omoto a kol., 2001); jesetera atlanského *A. oxyrinchus* (Van Eenennaam a Doroshov, 1998); jesetera bílého *A. trasmontanus* (Doroshov a kol., 1997); kalugy *Huso dauricus* jesetera sachalinského

Acipenser mikadoi a jeseter amurského *A. schrenckii* (Omoto a kol., 2004); jesetera ruského *A. gueldenstaedtii* (Akhundov a Fedorov, 1991).

Gonády jeseterovitých jsou párový orgán zárodečné linie. Zárodečná linie je tvořena původně malý počtem diploidních buněk, které mají jedinečnou proliferační a diferenciací kapacitu a vedou k tvorbě samčích a samičích gamet. Haploidní gamety vznikají ze svých prekurzorů meiozou, která je charakteristická pouze pro buňky zárodečné linie.

Anatomie gonád a vejcovodů je oproti ostatním rybám při umělém výtěru komplikovaná, jikry jsou ovulovány do tělní dutiny a nálevka vejcovodu se nachází v dorzální části dutiny tělní, přibližně v polovině délky těla. Při tlaku na břišní partie během umělého výtěru „klasickou metodou“ nastane přimáčknutí gonád na klenbu tělní dutiny a uzavření průchodnosti vejcovodů, dochází pak k uvolnění pouze části zralých jiker (v malých porcích). V praxi jak už bylo řečeno se tento problém řeší proříznutím vejcovodu.

Jeseteří gamety se od ostatních ryb liší především přítomností akrozomu podléhající akrozomální reakci u spermií, zatímco jikry se paradoxně liší přítomností většího počtu mikropyli (Ginsburg, 1959).

2.2.1. Popis a struktura jeseteří jikry

Počet jiker u jeseterovitých je velmi velký, může dosáhnout až k několika milionům 7 700 000 u *H. huso* (Babushkin, 1947), naproti tomu má *A. ruthenus* počet jiker relativně malý 8000-199 000 (Berg, 1948).

Jeseteří jikry jsou kulovitě až protáhlého tvaru. Velikost neoplozených jiker jednotlivých druhů je variabilní 1,9-2,0 mm u *A. ruthenus* (Berg a kol., 1949), 3,6-4,0 mm u *H. huso* (Dettlaff a Ginsburg, 1954). Barva jiker je šedohnědá, přičemž zbarvení v pólech jikry se liší, což odráží odlišnosti ve vnitřní struktuře. Animální pól jikry směřující po oplození nahoru je obvykle světlejší než vegetativní pól. Ve středu animálního pólu je světlé místo obklopené 2-3 tmavými soustřednými kruhy. Průměr světlého polárního místa, šířka a intenzita pigmentace soustředných kruhů a světlé oblasti mezi kroužky se značně liší nejen u jiker od různých ryb, ale také u jiker od stejné ryby. Animální pól jikry *A. gueldenstaedti colchinus* je někdy tak intenzivně pigmentován, že se stane tmavším než vegetativní pól. Někdy, ale jen velmi zřídka, jsou jikry světle žluté barvy bez tmavého pigmentu. Jikry tohoto typu byly nalezeny

u albinotických ryb. Další výjimku tvoří jikry jesetera bílého *A. transmontanus*, u kterého na rozdíl od charakteristických pigmentovaných kruhů kolem mikropylární oblasti jsou tyto jikry celé černé (Cherr a Clark, 1982).

2.2.1.1. Obaly jikry

Jikry jeseterů jsou obklopeny silným obalem, který chrání jikry před chemickými látkami a mechanickým poškozením (Esmaeili a Johal, 2005), zajišťuje přichycení jikry k výtěrovému substrátu, je jednou z možných prevencí před polyspermií a dále může fungovat jako atraktant spermií s antibakteriální ochranou funkcí. Obal jikry je složen ze tří hlavních po sobě jdoucích poměrně silných vrstev: nejsvrchnější alveolární vrstva s rosolovitou vrstvou, zona radiata externa a zona radiata interna spolu s mikroklkovitou vrstvou a vrstvou kortikálních alveol. U jesetera hvězdnatého *A. stellatus* je obal jikry průměrně 70 µm široký, přičemž na animálním pólu je poněkud tenčí (50 µm) než v průběhu zbývající části jikry (Dettlaff a Ginsburg, 1954). Pro srovnání je obal u většiny kostnatých ryb široký 2 až 50 µm (Kudo, 1983).

Ve všech třech hlavních vrstvách jsou základním stavebním prvkem svazky horizontálně orientovaných vláken prostoupených vertikálně směřujícími kanálky (póry), zajišťující komunikaci jikry s vnějším prostředím.

Rosolovitá vrstva

Nejsvrchnější vrstva o šířce 0,5-0,9 µm u *A. baerii* (Le Menn a Pelissero, 1991) se skládá z elektrolucentního jemně vločkovitého materiálu, pokrývá celý povrch jikry a ucpává póry alveolární vrstvy a mikropyle (Pšenička a kol., 2010). Rosolovitá vrstva se brzy po kontaktu s vodou obsahující Ca^{2+} a nebo Mg^{2+} ionty rozpustí (Cherr a Clark, 1984, Pšenička a kol., 2010).

Alveolární vrstva (L3)

V pozorování několika druhů jeseterů (Debus a kol., 2008) je alveolární homogenní vrstva zrnitá, 24-63 µm široká a prostoupená mnoha vertikálně orientovanými kanálky. Jejich průměr je větší než u kanálků v zona radiata externa a zona radiata interna. Alveolární vrstva nasedá na zona radiata externa.

Zona radiata externa (L2)

Tato vrstva o šířce 25-59 μm se skládá z horizontálně orientované sítě vláken protknutou kanálky (Debus a kol., 2008). Vlákná jsou v porovnání s níže ležící vrstvou zona radiata interna silnější a jsou navzájem méně hustě propojeny.

Zona radiata interna (L1)

Tato nejspodnější vrstva je 14-25 μm široká (Debus a kol., 2008) a skládá se z několika více či méně horizontálně orientovaných vrstev protkaných podélnými vlákny tvořící svazky tohoto vláknitého materiálu. Tyto vlákna jsou v průměru menší než vlákna v zona radiata externa a nasedají na sebe těsněji, takže průměr kanálků prostupující zona radiata interna je také menší.

Několik autorů popisuje pod zona radiata interna vrstvou v cytoplazmatické membráně oocyty vrstvu mikroklků též nazývanou extra oocyte matrix, slitlike nebo thin space (Le Menn a Pelissero, 1991; Aizenshtadt a Dettlaff, 1972). Vrstva, 1 μm široká, obsahuje četné mikroklky prostupující zona radiata interna a jikernou cytoplasmu.

Mikropylární otvory

V animálním pólu jikry se nacházejí mikropylární otvory, prostřednictvím nich mohou spermie proniknout do cytoplasmy jikry. Mikropyle může být specializované dosedové místo spermie, cílový orgán s konkrétním receptorem pro splynutí spermie a jeho ultrastrukturní vlastnosti se mohou mezi druhy lišit (Kudo, 1982). Srovnání ultrastruktury mikropylí mezi jikrami různých druhů ryb je v popředí zájmu. Touto srovnávací studií můžeme totiž například určit druh kaviáru. Počet mikropylí se u jeseterů výrazně liší v rámci různých druhů a také v jikrách od jedné ryby (Ginsburg, 1968; Podushka, 1993) až 52 mikropylí u *A. gueldenstaedti* (Ginsburg, 1968), 3-16 u *A. baerii* (Debus a kol., 2008) a u *A. ruthenus* 5- 13 mikropylí (Persov, 1957).

Mikropylární kanály jsou omezeny na malou oblast v blízkosti animálního pólu bez přesného uspořádání. U *A. stellatus*, *H. huso* a *A. gueldenstaedti* je vzdálenost mezi sousedními mikropylárními otvory obvykle 40-80 μm , méně často 100 μm . Při vyšším počtu mikropylí (10 mikropylí) je vzdálenost sousedních mikropylí 120-130 μm . U *A. gueldenstaedti* s 30 a více mikropylemi jsou mikropyle mezi sebou rozestoupeny 1000-1100 μm od sebe (Dettlaff a kol., 1993). Lze tedy usuzovat, že se zvyšujícím se

počtem mikropylí se paradoxně zvyšuje vzdálenost mezi mikropylemi. Mikropylární kanál se směrem do jikry zužuje a odpovídá profilu V, který v úrovni vrstvy zona radiata interna tvoří rozšiřující se ampuli. Mikropylární ampule je z části vyplněná cytoplazmou oocytu v podobě tzv. cytoplazmatického výběžku (Pšenička a kol., 2010; Ginsburg, 1959). Průměr mikropyle není výrazně širší než je šířka hlavičky spermie. Nejužší průměr mikropyle u *A. baerii* (1,95 μm) je jen o něco větší než průměr hlavičky spermie (1,13 μm) (Pšenička a kol., 2010). Naopak jikra kapra obecného *Cyprinus carpio* má mikropylární otvor dostatečně široký, aby jím prošlo několik spermií najednou (Kudo, 1980, 1982). Můžeme tedy tvrdit, že vnitřní průměr mikropylárního kanálu u jeseterů přispívá k prevenci polyspermie. Průměr mikropylí je v rámci druhů velmi variabilní, ale obecně se průměr mikropyle zvyšuje s rostoucím počtem mikropylí (Debus a kol., 2002). Struktura mikropylí se ve většině případů mezi rody *Acipenser* a *Huso* liší. Mikropyle ryb rodu *Huso* má hladké stěny s méně rozšířeným vstupem, zatímco mikropyle ryb rodu *Acipenser* jsou více rozšířené, proměnlivé hloubky, strukturovanější se žlábkováním, přičemž žlábkování je nejvýraznější u *A. gueldenstaedtii* (Debus a kol., 2002).

2.2.1.2. Alveolární granule

Alveolární granule, tj. kortikální granule jsou umístěny po celém obvodu jikry pod zona radiata interna. Exudát alveolárních granulí hraje důležitou roli při oplození. Kontakt spermie s cytoplasmou vajíčka je aktivačním impulzem, který v jikře vyvolává řadu změn: kortikální reakce, formace fertilizačního kónusu, sekrece hydrofobních koloid, bobtnání jikerných obalů a nástup lepivosti jiker.

Kortikální reakce, tj. exocytóza alveolárních granulí začíná po velmi krátkém zpoždění od splynutí gamet, ne více než po 2 s od splynutí (Ginsburg, 1961, 1987). V průběhu aktivace jikry nabobtnané alveolární granule prasknou a jejich obsah je rozlit pod zona radiata interna za vzniku úzkého perivitelinního prostoru. Vzniklý perivitelinní prostor izoluje po celém obvodu jikernou cytoplasmu a vlévá se do zbývajících prázdných mikropylí, u kterých nedošlo k penetraci spermií a blokuje tím vznik polyspermie (Cherr a Clark, 1985).

Alveolární granule jsou umístěny v jedné nebo dvou řadách. Jejich tvar může být kulatý, elipsoidní nebo nepravidelný a často s výběžky. Velikost alveolárních granulí

u *A. gueldentaedi* a *A. stellatus* se pohybuje od několika desetin až do 3-4 μm . Tyto granule obsahují komplexy proteinů a kyselých mukopolysacharidů (Dettlaff, 1962).

Pod vrstvou alveolárních granulí se nacházejí pigmentové granule a v hloubce 3-5 až 20 μm od povrchu pigmentových granulí se nacházejí tyčinkovité mitochondrie (Dettlaff a kol., 1993).

2.2.1.3. Vnitřní prostor jikry

Vnitřní prostor jikry je vyplněný cytoplasmou s velkým množstvím nutričních rezerv pro embryonální vývoj s zřetelně bipolární strukturou: vegetativní část obsahuje žloutkové granule a velké tukové kapičky, zatímco část animální obsahuje většinu objemu cytoplasmy s mnohem menší koncentrací nepatrných žloutkových granulí a malých tukových kapiček s rozpuštěným jádrem oocyty.

Jádro oocyty je během oogeneze přemístěno k animálnímu pólu. Zde se před ovulací jikry karyoplasma jádra rozpadne a tvoří síť vločkovité struktury obsahující centrosom a hydrofilní koloidy.

Rozpuštěné jádro zralé oplozenischopné ovulované jikry je v 2. metafázi meiozy s monasterem, který se nachází na povrchu oocyty blízko animálního pólu, poblíž místa předchozího oddělení 1. polárního tělíska.

2.3. Produkce chimér zárodečné linie

Chimerou rozumíme jedince, jehož tělo je tvořeno buňkami pocházejícími ze dvou různých jedinců. Pokud jsou chimérismem postiženy pohlavní buňky mluvíme o tzv. chiméře zárodečné linie. Mikromanipulacemi lze takovou chiméru vytvořit transplantací primordiálních gonocytů (PGC) nebo spermatogonií dárce do embrya příjemce (Braat a kol., 1999). U ryb je tato metoda relativně snadno proveditelná vzhledem k vnějšímu oplození a větší velikosti vajíček. Po transplantaci dárcovských PGC začnou tyto zárodečné buňky v hostiteli migrovat a kolonizovat genitální brázdou příjemce, kde se namnoží a diferencují do zralých gamet a nakonec umožní produkci potomků donora PGC. V současné době je u embryí ryb vyvinuto několik transplantačních technik PGC a navíc byl nedávno u ryb zaveden nový systém transplantace spermatogonií (Okutsu a kol., 2006). U ryb produkujících jikry větších rozměrů je uskutečnitelná metoda mikroinjikace, kdy se z embryí ve fázi somitů izolují PGC a ty se dále transplantují do

hostitele v oblastech marginálních (krajních) částí blastodisku, případně do embrya ve fázi somitů. U embryí menších rozměrů nastává při této metodě problém, kde je nesmírně obtížné jednak izolovat PGC od genitální brázdy a dále injikovat PGC do vyvíjejícího embrya. Pro tato omezení byla vyvinutá nová metoda, která je založena na transféru pouze jedné PGC (Saito et al., 2008). U jeseterovitých jsou embrya pro potenciální transfér PGC dostatečně velká.

Další metodou byla u několika druhů ryb použita mikroinjikace části blastoméry ve fázi blastuly u zebřičky pruhované *Danio rerio* (Lin et al., 1992), medaky japonské *Oryzias latipes* (Wakamatsu et al., 1993) a pstruha duhového *Oncorhynchus mykiss* (Takeuchi, et al., 2001), nebo sestavením tzv. sandwich chimery vložením spodní části blastodermu mezi oddělené části blastuly příjemce (*Danio rerio*, Lin et al., 1992; *Oryzias latipes*, Wakamatsu et al., 1993; Yamaha et al., 2001). Při těchto metodách transplantujeme část blastuly, ve které se předpokládá výskyt PGC spolu se somatickými buňkami. V zájmu zvýšení účinnosti transferu buněk zárodečné linie je důležité provést transfer v určitých vývojových stádiích embryí.

2.3.1. Sterilizace hosta určeného k produkci zárodečné chiméry

Nezbytnou podmínkou pro produkci potomstva zárodečných chimér je odstranění nebo snížení počtu endogenních PGC embrya příjemce, protože zvýšený podíl heterogenních PGC v zárodečné chiméře nám nezajistí dostatečnou produkci potomstva zárodečných buněk donora.

Existuje několik strategií sterilizace hosta. Metoda triploidizace je realizovatelná pouze u ryb s 2n ploidní úrovní. Jeseteři mají ploidii přirozeně různě vysokou. Podle nejpodporovanějšího řazení se jeseteři dělí na tyto skupiny: funkční tetraploidy 4n (např. *A. ruthenus*), hexaploidy 6n (např. *A. baerii*) a oktaploidy 8n (např. *A. mikadoi*). Jelikož 5n jeseter malý je stále schopný produkovat oplození schopné gamety, je sterilizace hosta úpravou ploidie v případě jeseterů metodou nepoužitelnou (osobní sdělení).

Další metodou je dočasné vyřazení exprese *vasa* nebo *nanos* genů, vyskytující se především v PGC morfolinem. Morfolino je molekula, která modifikuje expresi určitých genů po dobu jeho dočasné existence. Proces dočasného vyřazení *vasa* nebo

nanos genu funguje na 2 úrovních, při splicingu pre-mRNA a translaci mRNA. Před splicingem se morfolino naváže na známou sekvenci *vasa* či *nanos* genu v pre-mRNA. Kódující extrony se sekvencí *vasa* nebo *nanos* genu jsou při splicingu společně s nekódujícími introny vystřihány a dočasně se tak vyřadí činnost *vasa* nebo *nanos* genů. Při druhém mechanismu působení se morfolino naváže na úsek mRNA a zablokuje translaci mRNA na ribozomu.

Metoda „knock down“, kdy trvale vyřadíme *vasa* nebo *nanos* geny je již genová modifikace organismu a z důvodu střetů s legislativou je tato metoda pro sterilizaci hosta méně vhodná.

A nakonec strategie chemických látek potlačují gametogenézy v podobě koupelí a krmiv v různých vývojových stadiích nezaručují 100% účinnost a dostatečnou bezpečnost zdraví ohrožující práce.

2.3.2. Využití chimér zárodečné linie

Primordiální buňky jsou jediné buňky v embryích ryb, které zajišťují přenos genetické informace pro příští generace, proto mají potenciální význam genového inženýrství. Mikromanipulace s gametami ryb nám umožňuje zdokonalit systém uchování genetických zdrojů ohrožených druhů kryokonzervací zárodečných buněk. V kombinaci s mezidruhovým transferem PGC dokonce i u fylogeneticky velmi vzdálených druhů, tj. xenogenetickou transplantací můžeme zefektivnit produkci komerčně chovaných ryb či posílit stavy ohrožených druhů. Mezidruhový přesun PGC může umožnit extrémní zkrácení generačního intervalu některých dlouho dozrávajících druhů ryb tak, že transplantujeme zárodečné buňky dlouho dozrávajících ryb do embryí rychleji dozrávajících druhů. Transplantované buňky by se pak při jejich zrání teoreticky řídily hormonální úrovní hosta. Toho by šlo využít především u později dozrávajících druhů jeseterů, jako např. *Huso huso* (18 let) v roli donora a *Acipenser ruthenus* (5 let) v roli hosta. Podobnou myšlenkou se v současné době zabývá např. Tokijská Univerzita Marine Science a Technology, kde uvádějí dva druhy čeledi makrelovitých, tuňáka obecného *Thunnus thynnus* dozrávajícího za 7–8 let při 300 kg v roli donora PGC a makrelu obecnou *Scomber scombrus* v roli hosta dozrávající za půl roku při 0,3 kg. Pokud by se transplantovaná PGC ujala, tak zde máme předpoklad až 16–ti násobného zkrácení generačního intervalu a inkubace gamet tuňáka v těle makrely v akváriích (Yoshizaki, 2010).

2.3.3. Vznik a význam PGC

PGC vznikají jako malá populace buněk oddělená od somatických buněk (Wylie, 1999; Raz, 2002). V rybách se gamety tvoří z velkého množství zárodečných buněk, ty ale pocházejí jen z několika desítek PGC (Saito a kol., 2006). U žab a ryb je mitotická PGC aktivita během embryogeneze nízká, PGC zůstávají během své migrace mitoticky klidné a rapidní zmnožení zárodečných buněk se spustí až v budoucích gonádách. Mitotická aktivita PGC u většiny ryb zaniká v púlce somitogeneze (Timmermans a Taverne, 1989).

Stejně jako u jiných obratlovců, zárodečné buňky ryb migrují v určitých fázích embryonálního vývoje z místa svého vzniku směrem k zárodečné brázdě nebo její předpokládané oblasti (Braat a kol., 1999), kde se jak bylo zmíněno v budoucích gonádách namnoží a diferencují do gamet.

Migrace zárodečných buněk prostřednictvím podkožní tkáně směrem k oblasti budoucí zárodečné brázdy nastane velmi brzy, dávno před rozvojem pohlavních brázdy. To naznačuje, že migrace zárodečných buněk není indukovaná nebo ovládaná molekulami produkovaných buňkami pohlavní brázdy, jak je tomu u některých savců (Godin a kol., 1990), nicméně některé studie potvrzují produkci chemokinu v oblasti gonád, jakožto chemoatraktantu migrujících PGC u *Danio rerio* (Doitsidou a kol., 2002). Zda-li je diferenciace zárodečných buněk u ryb autonomní nebo závislá na indukčních interakcích nebylo doposud zcela zodpovězeno.

Obecně rozeznáváme dva hlavní různé způsoby diferenciace zárodečných buněk. U některých živočichů mohou být zárodečné buňky identifikovány velmi časně v embryonální fázi vývoje, kde je jejich diferenciace na zárodečné buňky zajištěna pomocí maternálně děděných determinantů před nebo v průběhu fertilizace. Tento typ diferenciace se nazývá preformace. U jiných živočichů nejsou zárodečné buňky pozorovatelné až do pozdního vývoje a vznikají jako výsledek induktivního signálu sousední tkáně, tento vývoj zárodečných buněk se nazývá epigeneze. Studie embryí bezocasých obojživelníků, které vykazují podobný embryonální vývoj jako jeseteři, poskytují první experimentální důkazy o preformaci a roli zárodečné plasmy ve vajíčku při specifikaci zárodečných buněk obratlovců (Bounoure, 1939). Během časně oogeneze žáby drápatky vodní *Xenopus laevis* je tato specializovaná plasma syntetizována a lokalizována na vegetativním pólu oocyty, kde se skládá ze shluku desítek až stovek

mitochondrií, tvořící tzv. mitochondriální mrak neboli Balbianiho tělísko obsahující zárodečnou plasmu (germ plasm). Zde se vyskytují elektrodenzní granule tzv. nuage, které jsou prekurzory zárodečných granulí. Ve fázi oogonií je Balbianiho tělísko patrné v blízkosti jádra jako elektrodenzní materiál obklopený množstvím mitochondrií. V previtelogenní fázi I oocyty má sférickou strukturu, která obsahuje stovky mitochondrií, stovky nuage, RNA (Xcat2, Xlirts, a Xpat), RNA-binding proteiny, endoplasmatické retikulum, a Golgiho komplexy. Během previtelogenéze a vitelogenéze migruje Balbianiho tělísko od jádra k vegetativnímu pólu oocyty, kde se postupně se rozptýluje ve vegetativní cytoplasmě (Heasman a kol., 1984; Houston a King, 2000; Kloc a kol., 2001; Kloc a kol., 2002; Zhou a King, 1996). Během a následně po fertilizaci je zárodečná plazma vajíčka *Xenopus laevis* nestejně rozptýlena ve vegetativní hemisféře vajíčka, kde je při rýhování buněk nerovnoměrně oddělována a nakonec specificky zabudována do několika buněk, ze kterých se stávají PGC (Whittington a Dixon, 1975).

Vývoj Balbianiho tělíska u *Xenopus laevis* se právě podobá vývoji u jeseteřích oocytů. Zelazowska a kol. (2007) potvrdila v průběhu oogeneze u *Acipenser gueldenstaedtii* přítomnost nuage se zárodečnou plazmou. Vzhledem k tomu, že zárodečná ooplasma s nuage u jeseterů je méně vymezená na určitou oblast oocyty a netvoří vlastní tělísko jako Balbiani tělísko, byla tato oblast nazvána Balbiani cytoplasmu, ovšem informace o Balbianiho cytoplasmě nebo zárodečné plasmě uzralých, ovulovaných a oplozených vajíček jeseterů chybí.

Nuage obsažené v zárodečné cytoplasmě v průběhu vzniku PGC prodělávají přestavbu v tzv. zárodečné granule. Zárodečné granule jsou specifické pouze pro zárodečné buňky a byly pozorované ve většině fází gametogenéze ryb (PGC, oogonie, oocyty, spermatogonie, spermatocyty, spermatidy) (Eddy, 1975, Wallace a Selman, 1990). Zárodečné granule obsahují proteiny, RNA a jsou prostoupeny fibronukleárním materiálem, ovšem jejich úloha a původ jsou nejasné. Toury a kol. (1977) a Azevedo (1984) se domnívají, že se účastní na vytváření nových mitochondrií a ribozómů. Podle dalších studií představují uložisko RNA a proteinů, které mohou být nezbytné pro diferenciaci a nebo vznik PGC (Williamson a Lehmann, 1996; Ikenishi, 1998). V počátečních fázích embryogenéze u *Oryzias latipes* byly zárodečné granule pozorovány ve větším množství v pozdní migraci PGC než na počátku pozorování, což naznačuje, že probíhá neo-syntéza tohoto materiálu (Hamaguchi, 1985). S opakovanou

syntézou zárodečných granulí je spojena i změna jejich struktury, patrně vyplývající ze ztráty některých jeho složek, které nastanou během procesu syntézy (Hamaguchi, 1993). Ovšem nejdramatičtější změny ve struktuře jsou popsány na počátku migrace PGC, mohou se tedy podílet na diferenciaci zárodečných linií.

U jesetra jadranského *A. naccarii* byly zárodečné granule pozorovány během pozdějšího embryonálního a postembryonálního vývoje v těsné blízkosti jádra a jaderných pórů PGC, v blízkosti jaderného obalu nebo v úzkém spojení s mitochondrií a nebo ve spojení s prstencovitými lamely, ve všech typech zárodečných buněk až do primárních oocytů (Grandi a Chicca, 2008). Navíc byl u *A. naccarii* v pachytenní fázi meiozy oocytu sledován blízký vztah mezi mitochondriemi a zárodečnými granulemi s tvorbou velkých komplexů, které zmizí v následující perinukleolární fázi, kde zárodečné granule stále přetrvávají zatímco mitochondrie a dalších organel navýšily jejich počet.

2.3.4. Vizualizace PGC a příprava jikry k injikaci GFP

Dříve jsme byli odkázáni pouze na histologické nálezy PGC, byly identifikovány podle jejich umístění a charakteristického vzhledu zejména: kulatého tvaru, velkého jádra a relativně velké velikosti jak již bylo uvedeno dříve u jiných ryb (Braat a kol., 1999; Kazama-Wakabayashi a kol., 1999; Nagai a kol., 2001).

V nedávné době se podařilo v zárodečné cytoplazmě PGC identifikovat *vasa* a *nanos* geny. Tyto molekulární markery umožňují identifikaci, lokalizaci, izolaci a transplantaci PGC. U kostnatých ryb je v současné době používána tzv. fluorescence in situ hybridizace (FISH). Kdy se fluorescenční látka GFP (zelený fluorescenční protein) váže na konkrétní sekvenci *vasa* nebo *nanos* genu přítomného v PGC (GFP-*nos1* 3'UTR mRNA a nebo GFP-*olvas* 3'UTR mRNA. Přičemž GFP konjugovaný s *nos1* 3'UTR mRNA fluorescent se zdá být funkční pro více rybích druhů (Saito a kol., 2008).

Pro úspěšnou vizualizaci PGC v oplozené jikře je důležité aplikovat fluorescent do oblasti prekursoru PGC. V případě jeseterů je tímto prekurozorem Babianiho cytoplasma s nuage, jejichž lokalizace je náplní této studie.

Jako další injikační metodou byla u *Oncorhynchus mykiss* úspěšně vyzkoušena syntetizovaná sloučenina fluorescein isothiokyanát (FITC)-dextran (FD-4, Sigma) (Takeuchi a kol., 2001).

U jiker některých druhů ryb je obal jikry silný a mechanicky odolný, takže je zapotřebí nejprve obal před injikací odstranit.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Získání gamet a jejich zpracování

Ke studii byly použity spermie a vajíčka *Acipenser baerii* z chovu Genetického rybářského centra Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech. Oplození proběhlo standardně podle metodiky Gela a kol. (2008).

Zralé jikernačky a mlíčáci *Acipenser baerii* byli drženi odděleně v nádržích při teplotě vody 15 °C. K indukci spermiace a ovulace byly ryby intramaskulárně injikovány kapří hypofýzou. Mlčáci v dávce 4 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti a jikernačky ve dvou dávkách: první 0.5 mg.kg⁻¹ a druhá 4.5 mg.kg⁻¹ tělesné hmotnosti s 12 hodinovým intervalem. Sperma bylo odebráno kanylou 48 h po injikaci, ještě před ovulací jikernaček a skladováno při 4 °C do jeho použití. Ovulované jikry byly získány 18 – 20 hod. od druhé injikace mikrochirurgickým proříznutím vejcovodu. K inseminaci jiker bylo použito heterosperma s více než 90% motilních spermií a k aktivaci gamet voda z líhně. Jikry byly individuálně umístěny do Petrino misek a smíchány s aktivovaným heterospermatem v poměru 1 kg jiker : 25 ml heterospermatu : 4 litry vody. Inkubace jiker probíhala v Petriho miskách.

3.2. Příprava preparátu pro transmisní elektronovou mikroskopii

Obraz preparátů je při transmisní elektronové mikroskopii (TEM) tvořený elektrony, které prochází vzorkem a umožňují nám pozorování vnitřní struktury velmi malých objektů, které již nelze pozorovat pod optickým mikroskopem. V našem případě se jednalo o oplozenou nebo vodou aktivovanou jikru. Biologický materiál se může obecně snadno znehodnotit a proto vyžaduje šetrnou přípravu. Pro správnou interpretaci výsledků musí být vzorek pro elektronové mikroskopii ve správnou dobu zafixován a dále specificky zpracován.

Celková příprava preparátu pro TEM trvá několik dní a zahrnuje několik etap: fixaci vzorku, odvodnění, zalití do bločku, krájení na ultratenké řezy a nakonec kontrastování tenkých řezů vzorku.

3.2.1. Chemická fixace vzorku

Kvalitní fixace je základním předpokladem úspěchu. Cílem tohoto kroku bylo stabilizovat a zachovat buněčné struktury, zastavit degradační změny a zpevnit povrchovou strukturu vzorku. Chemická dvoustepňová fixace glutaraldehydem a oxidem osmičelým zajišťuje dostatečnou stabilizaci a imobilizaci bez větších ultrastrukturálních změn. Aby vzorky nebyly zdrojem artefaktů a špatných interpretací bylo nutné dodržet přesně stanovené podmínky fixace uzpůsobené velikosti vzorku: čistotu a koncentraci fixačních činidel, teplotu, osmolalitu, pH fixačního roztoku a expoziční dobu fixace.

Jikry byly 30, 60 sekund a 30 minut po oplození nebo pouhém aktivování vodou, fixovány 2,5% glutaraldehydem v 0.1 M fosfátovém pufru (pH 7.2) přes noc a teplotě 4 °C. Naředěný roztok musel mít příslušnou osmolalitu a pH, aby nedošlo k objemovým změnám vzorku. Poté byly vzorky třikrát promyty v samotném pufru. Promyté vzorky od glutaraldehydu byly zality k následné postfixaci do 4% oxidu osmičelého (OsO₄) s 0,1 M fosfátovým pufrům po dobu 1 h při pokojové teplotě. Poté byly vzorky třikrát promyty v pufru.

3.2.2. Dehydratace vzorku

Zafixovaný biologický preparát pro elektronovou mikroskopii nesmí obsahovat vodu, protože jsou vzorky v mikroskopu vystaveny vysokému vakuu. Ze zavodněných preparátů by se voda ve vakuu rychle uvolňovala, což by mělo za následek jednak degradaci vzorků a za druhé by se znesnadňovala cesta elektronům, které by se srážely s molekulami vody

Odvodnění vzorku se provádí postupným nahrazením volné vody ve vzorku vhodným organickým rozpouštědlem, ethanolem nebo acetonem. Dehydratace bývá častým zdrojem artefaktů v podobě objemových změn, přičemž aceton vykazuje menší míru poškození vzorku a je tak pro pozorování jemných struktur vhodnější.

V našem případě proběhla dehydratace vzorku v acetonové řadě s rostoucí koncentrací acetonu - 30, 50 70, 80 , 90, 95, 100 % po 15 minutách. Komerčně

dodávaný čistý aceton obsahuje vodu a je třeba jej vysušit přidáním bezvodého síranu měďnatého nebo chloridu vápenatého. Absolutní aceton byl připraven promícháním s bezvodou modrou skalicí. Vody zbavený absolutní aceton bylo pro ředění a dehydrataci třeba odebírat opatrně, aby povrch vzorku nebyl nekontaminován krystalky nerozpuštěné modré skalice.

3.2.3. Zalévání vzorku

Zalítím zpracovávaného vzorku pryskyřicí docílíme vlastností vhodných pro krájení vzorku na ultratenké řezy do maximální tloušťky 100 nm. Silnějšími preparáty elektrony neprojdou a pokud ano, je obraz zatížený značnou chromatickou vadou a nelze jej zaostřit.

Druhy pryskyřic se v současné době na trhu nacházejí v poměrně širokém spektru a jejich výběr se řídí podle účelu a typu vzorku. Obecně pryskyřice pro zalévání vzorku musí splňovat několik parametrů: dostatečná mechanická pevnost v tenké vrstvě, stabilita ve vakuu a při ozáření elektrony, nesmí přispívat svojí vlastní strukturou na výsledný obraz vzorku, polymerizace pryskyřic by měla být rovnoměrná bez objemových změn a poškození ultrastruktury vzorku, pryskyřičné směsi musí mít nízkou viskozitu a mají být rozpustné v běžných dehydratačních činidlech, aby bylo možné vzorek pryskyřicí snadno infiltrovat a vzniklé bločky by měly mít dostatečnou tvrdost ke krájení.

Typ a kvalita zalévacího média ovlivňuje do značné míry výsledek řezání. Řezání měkkých, špatně polymerizovaných nebo málo prosycených bloček vede při řezání bločku k potížím.

Pro zalévání a infiltraci vysušených vzorků jiker byla použita tříložková pryskyřice Polybed 812, která patří do skupiny vícesložkových epoxidových pryskyřic. Její předností je vyrovnaná polymerace bez větších objemových změn.

Infiltrace pryskyřicí probíhala v řadě roztoků s acetonem se stoupající koncentrací 1/3, 2/3 končící čistou pryskyřicí v hodinových intervalech. Z důvodu relativně silných obalů jiker jesetera bylo k infiltrování pryskyřice do vzorků použito mikrovlnné záření. Vzorky s infiltračním médiem byly umístěny do zkumavky. Zkumavka byla ponořena do vodní lázně, aby se vzorek při vystavení záření nezahřál a vodní lázeň se zkumavkou byla na 1 min. vložena do mikrovlnné trouby nastavené na výkon 80 W. Mikrovlnné záření rozpohybuje molekuly, které zajistí lepší infiltraci pryskyřice vzorkem. Vzorky

v čisté pryskyřici byly z důvodů lepší infiltrace pryskyřice, odvzdušnění vzorků a zamezení absorbování vzdušné vlhkosti, na noc uloženy do exsikátoru napojeným na vodní vývěvu.

K zalití vzorků byly použity ploché formy. Teplotní polymerizace pryskyřice probíhala v termostatu při teplotě 70 °C po dobu 12 hod. Při zalévání vzorku bylo nutné jehlou odstraňovat bublinky vzduchu, které se vyskytovaly v okolí vzorku. Pryskyřicí zalité jamky se po ztvrdnutí vymačkaly a vzniklý bloček se vzorkem byl připraven k další úpravě.

3.2.4. Krájení ultratenkých řezů

Pro pozorování preparátů TEM musí mít preparáty maximální tloušťku 100 nm, optimálně 60 – 70 nm. Obecné pravidlo o tloušťce preparátu praví čím tenčí jsou ultratenké řezy, tím lepší je rozlišení struktur v obraze, ale slabší kontrast. Před zahájením krájení ultratenkých řezů se provádí úprava bločků trimováním, tzn. seříznutí bločku do tvaru čtyřbokého komolého jehlanu. Dále byly vzorky krájeny skleněným nožem na tzv. polotenké řezy o tloušťce 0.5 – 2 μm . Polotenké řezy byly barveny toluidinovou modří a pozorovány pod světelným mikroskopem. Na základě toho byly krájené plochy bločku seříznuty minimálně do velikosti šířky použitého diamantového nože. Upravené bločky byly dále krájeny na ultratenké řezy. Nakrájené ultratenké řezy byly sbírány z vodní hladiny nože na síťky a vzorek byl připraven k poslední fázi jeho zpracování.

Nastavení parametrů krájení

Rychlost řezání je nastavitelný parametr, který se může pohybovat v intervalu 0,1-10 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Její nastavení se odvozuje od tvrdosti bločku a typu nože. Čím je bloček tvrdší, tím pomalejší se volí řezná rychlost. U diamantových nožů se z opatrnosti upřednostňují pomalejší rychlosti. Použitý Polybed 812 patří k tvrdším typům pryskyřic a navíc byl pro ultratenké řezy použit diamantový nůž, proto byla zvolena pomalejší řezná rychlost.

Úhel krájení je dán součtem úhlu nože a úhlu zábřitu. Při použití nože s úhlem hrany 45° je možno úhel zábřitu nastavit v rozmezí od 4 do 6°. Změna celkového úhlu krájení, nastavením úhlu zábřitu může odstranit potíže se stahováním skrojených řezů z hrany nože na vodní hladinu. Pro tenčí řezy se volil menší úhel zábřitu.

Ultratenké krájení

Krájení řezů se provádí na tzv. ultramikrotomech, v našem případě se jednalo (Leica Mikrosysteme GmbH, Rakousko), mechanický ultramikrotom. Pro kvalitnější krájení ultratenkých řezů jiker bylo použito diamantových nožů,

Do vahadla ultramikrotomu byl umístěn bloček či polotenký řez, který byl orientován podle polohy mikropylárních otvorů na jikře. Před vlastním krájením bylo třeba u řezné hrany nože nainstalovat vaničku s vodou, tak aby se hladina vody dotýkala řezné hrany nože a dobře se na ní odrazilo světlo. Po ustanovení vaničky, nože a vzorku ve vahadlu byly nůž a vzorek k sobě přibližovány. Vzdálenost byla kontrolována pomocí stereomikroskopu. Stín, který vrhala hrana nože na čelo bločku či polotenkého řezu nám prozradil, kdy byly vahadlo a nůž v rovnoběžné poloze. Po přiblížení do rovnoběžné polohy byl zapnut automatický posun vahadla zajišťující rovnoměrné skrajování řezů na hladinu vaničky.

Zbarvení ultratenkého řezu charakterizovalo tloušťku provedeného řezu. Při správném nasměrování osvětlení vaničky došlo k odrazu světla na povrch řezu splaveného na vodní hladinu. Důsledkem interference světla měly řезы v závislosti na své tloušťce určitou barvu. Pro pozorování námi použitým TEM byly nejvhodnější stříbrno-zlatě až zlatě zbarvené řезы.

Během odkrajování ultratenkých a polotenkých řezů občas docházelo k jejich deformaci, na horní straně byl řez stlačován a na spodní straně zas natahován a výsledné řезы byly po skrojení navlněné a nerovné. Proto se před sebráním ultratenkých řezů na síťku řезы vytahovaly působením par chloroformu nebo teplem.

Sít'ky

Pro snadnou a šetrnou manipulaci s ultratenkými řезы se používají sít'ky. Manipulace se sít'kami je prováděna pomocí pinzet různých druhů.

Pro pozorování co největší plochy jsme používali sít'ky s velkými otvory. Pro naše pozorování byla zvolena sít'ka s ultratenkou loukotí, která je výrazně transparentnější. Aby vzorek přes otvory sít'ky nepropadl, nebo aby nedošlo k jeho prohnutí a popraskání bylo nutné sít'ku potáhnout vhodnou folií. Pro podepření našich ultratenkých řezů byla sít'ka potažena formvarovou nebo uhlíkovou tenkou blankou.

Plovoucí řezy na vodní hladině se sebraly sítkou. Sítky s řezy se pak skladovaly v Petriho misce vyložené filtračním papírem.

3.2.5. Kontrastování ultratenkých řezů

První kontrastování vzorku při fixaci OsO_4 je pro pozorování jednotlivých struktur nepostačující, proto je nutné struktury na ultratenkých řezech dostatečně zvýraznit. Nejpoužívanějším způsobem kontrastování řezů je selektivní adsorpce těžkých kovů na buněčné organely. Absorbované těžké kovy na strukturách vzorku zvýší rozptyl elektronů a proto dochází ke zvýraznění těchto struktur. Pro zvýraznění struktur ultratenkých plátků našich vzorků byly použity kontrastovací činidla octan uranylu a citrát olova. Reakce octanu uranylu probíhá především s nukleovými kyselinami a proteiny, navíc reakce musí probíhat ve tmě, protože v přítomnosti světla v roztoku vzniká hnědá sraženina. Druhým krokem kontrastování je reakce citrátu olova, který kontrastuje proteiny, membrány, glykogeny a nukleonové kyseliny. Citrát olova zase reaguje se vzdušným CO_2 za vzniku nerozpustného uhličitanu olovnatého, proto by měl být při kontrastování tímto roztokem minimalizován styk se vzduchem. Vlastní kontrastování se provádí na hladině kontrastující látky, tj. stykem ultratenkého řezu s povrchem kapky kontrastujícího roztoku. Kontrastování může být častým zdroje artefaktů, hlavně z důvodu tvorby sraženin v podobě precipitátů. O výsledku kontrastování rozhoduje pečlivá příprava roztoků, rychlé přenášení sítěk s řezy na kapky a důkladné oplachování sítěk po jednotlivých fázích kontrastování.

Na alobalém zastíněné Petrino misky s kouskem parafilmu se nakapal alkoholický 1% roztok octanu uranylu. Kapání octanu bylo provedeno injekční stříkačkou přes jednorázový filtrační papír s velikostí ok $0,45 \mu\text{m}$. Filtrace byla nutná, protože roztok mohl obsahovat nechtěné precipitáty. Při kapání bylo nutno dělat kapky co největší, protože díky rychlému odparu hrozil vznik sraženiny. Na kapky se pinzetou přenesly sítky s ultratenkými řezy. Asi po 10-15 min. se sítky odundaly a opláchly 30% alkoholem.

Po vykontrastování určitých struktur octanem uranylu byly řezy kontrastovány roztokem citrátu olova. Do Petriho misky s parafilmem se přidalo několik peciček NaOH nebo KOH, ty se pak zalily se vodou, což mělo za následek snížení obsahu CO_2 v Petriho misce.

Roztok citrátu olova se před použitím musel centrifugovat aspoň na 5 min. při 15 tisících otáčkách. Vycentrifugovaný citrát olova, odebraný těsně pod hladinou centrifugační zkumavky se aplikoval opět v podobě kapiček. Tentokrát se musely kapky dělat co nejmenší, aby se minimalizoval styk roztoku se vzduchem. Po 10-15 min. namáčení v citrátu olova se sít'ky se vzorky důkladně opláchly destilovanou vodou, osušily a uložily do zásobníku nebo Petriho misek.

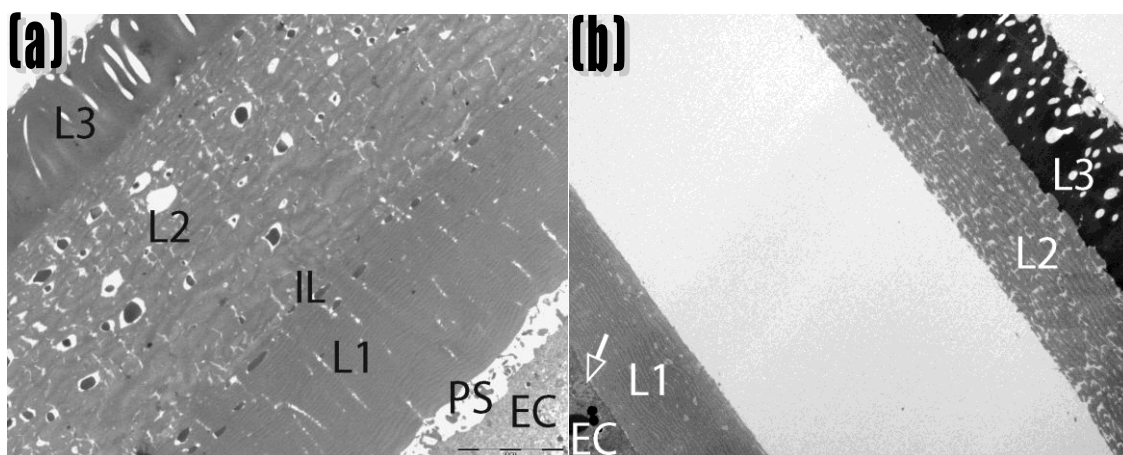
3.3. Pozorování a zpracování získaných snímků

Pro pozorování preparátu a pořizování mikrosnímků byl použit JEOL 1010 (JEOL Ltd., Tokyo, Japonsko). Konečným výstupem z TEM byl digitální záznam obrazu pozorovaného preparátu. Námi pořízené digitální TEM mikrosnímky byly dále zpracovány MicroImage 4.0 softwarem.

4. VÝSLEDKY

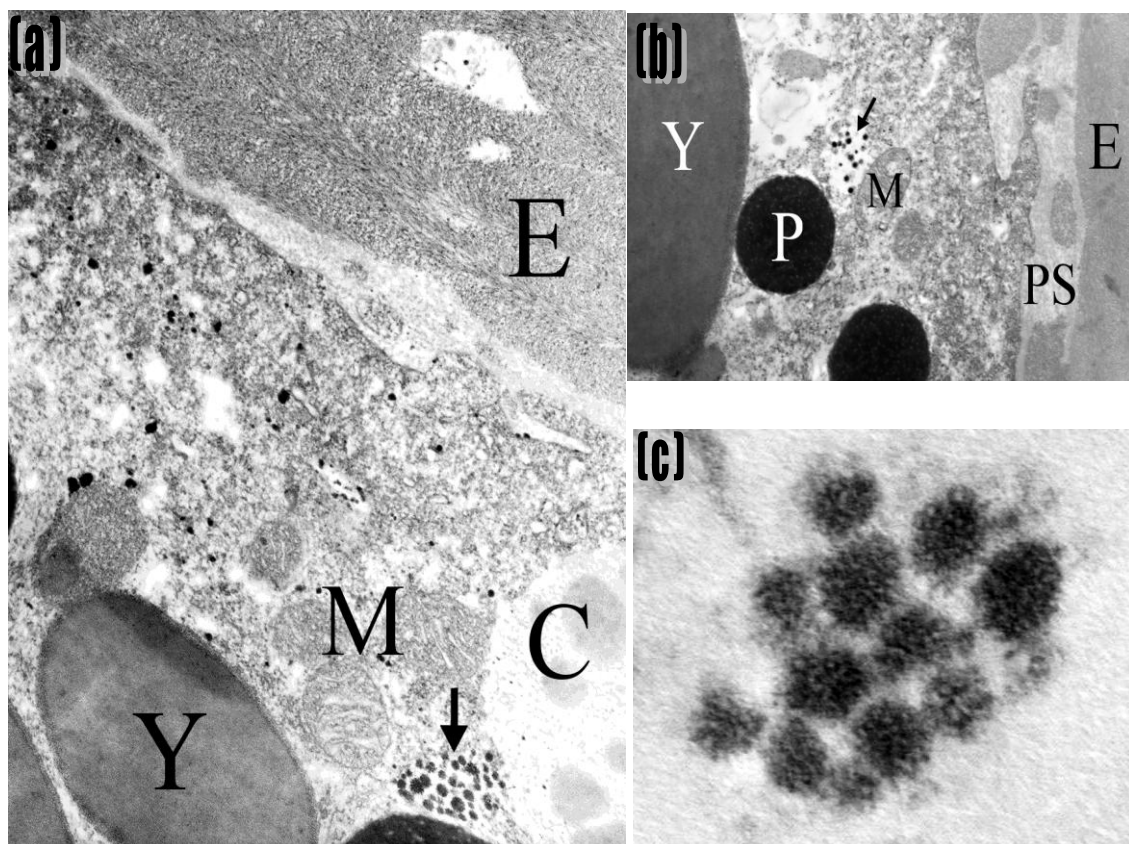
Obal jikry jesetera sibiřského v průběhu oplození obsahuje 3 hlavní vrstvy: alveolární vrstva na povrchu pokryta rosolovitou lepivou vrstvou, zona radiata externa a zona radiata interna. Těsně pod obalem jikry jsou v případě neoplozené jikry kortikální alveoly, které v průběhu aktivace vodou bobtnají, a v případě oplozené jikry rychle se zvětšující perivitellinní prostor, dále pak mitochondrie, pigmentové, žlutkové a lipidové granule. Ty se začínají vyskytovat postupně od obalu v uvedeném pořadí, přičemž mitochondrie jsou více obsaženy na animálním pólu pod mikropylárními otvory. Po 1 h od aktivace vodou jsou alveolární vrstva a zona radiata externa odděleny od zona radiata interna (Obr. 1a,b). Na tento proces nemá oplození žádný vliv, což dokazují neporušené kortikální alveoly na obrázku 1b.

Elektronová mikroskopie dále odhalila shluky elektrodenzních granulí tzv. nuage (prekurzory zárodečných granulí). Ty byly nalezeny pouze na vegetativním pólu jikry, těsně u jikerného obalu, přímo naproti mikropylárním otvorům. Nuage byly v cytoplasmě jikry rozptýleny do 10-20 klastrů, průměrně 268 nm velikých, často v blízkosti několika mitochondrií, endoplasmatických retikul a Golgiho komplexů. Ovšem netvořila s těmito organelami žádné komplexy. Jeden klastr nuage obsahoval 10-40 průměrně 23 nm velikých granulí (Obr. 2a,b,c).



U popisovaných jiker byl potvrzen normální průběh fertilizace, což dokazuje kortikální reakce a tvořící se periviteliní prostor mezi cytoplasmou a obalem vajíčka.

Obr. 1 Snímky z transmisní elektronové mikroskopie 5000x zvětšené ukazují rozdíly mezi oplozeným vajíčkem po jedné minutě od oplození (a) a vajíčkem aktivovaným vodou bez oplození po 30 minutách (b), kde dochází k oddělení alveolární vrstvy (L3) a zona radiata externa (L2) od zona radiata interna (L1) v místě vmezežené vrstvy (IL). Mezi obaly a cytoplasmou vajíčka (EC) se v případě neoplozeného vajíčka vyskytují kortikální alveoly (šipka) a v případě oplozeného vajíčka periviteliní prostor (PS).



Obr. 2. Transmisní elektronová mikroskopie jiker 30 s po osemenění (a) 20000x a (b) 30000x zvětšeno ukazující nuage (šipka), obal vajíčka (E), mitochondrie (M), periviteliní prostor (PS) nebo kortikální alveol (C), žlutková granule (Y), pigmentová granule (P) a detail nuage (c) 100000x zvětšený.

5. DISKUZE A ZÁVĚR

PGC kostnatých ryb byly na základě morfologických kritérií, a to především na základě přítomnosti zárodečných granulí, zpětně vysledovány až do počátku fáze somitů u karase stříbřitého, *Carassius auratus*, (Kazama–Wakabayashi a kol., 1999), fáze gastruly u *Oryzias latipes* (Gamo, 1961) a parmičky nádherné *Barbas conchoniuss*, (Timmermans a Taverne, 1989), nebo pozdní fáze blastuly u *Danio rerio* (Nagai a kol., 2001). Cytochemickým značením, injekcí fluorescenční sondy - zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) konjugovaným s *vasa* nebo *nanos* genem do jikry po oplození byly PGC nalezeny u *Danio rerio* (Yoon a kol., 1997), *Oryzias latipes* (Shinomiya a kol., 2000), *Oncorhynchus mykiss* (Yoshizaki a kol., 2000), *Carassius auratus* (Otani a kol., 2002) a dalších kostnatých ryb (Saito, 2006). Tyto studie navíc prokázaly druhově specifické rozdíly v původu a migračních drahách PGC, ale zatím se nenašel vztah mezi migračními vzory PGC a fylogenetickou vzdáleností mezi druhy. Proto je důležité k objasnění obecných zásad migrace a původu PGC popsat každý druh zvlášť. U *Acipenser naccarii* se migrující PGC podařilo najít, zatím pouze histologicky, až v pozdních fázích embryonálního vývoje, období kulení (Grandi a Chicca, 2008). Migrující PGC zde byly přibližně 30 x 15 μm veliké, kulovitěho tvaru s nápadným lalokovitým jádrem obsahující jemně zrnitý chromatin a jedno či více jadérek, dále cytoplasmu bohatou na dlouhé cisterny granulárního endoplazmatického retikula, mitochondrie, prstencovité lamely a zárodečné granule. Ty byly podobné těm, popsaných v této studii u oplozených vajíček jesetera sibiřského. Podobná charakteristika byla popsána již dříve u jesetera ruského *A. gueldenstaedtii* (Akhundov a Fedorov, 1991). Ovšem studie značící PGC jeseterů cytochemicky, s možností sledování jejich migrace či transplantace, zatím stále chybí. Pro správnou funkci se musí fluorescenční sonda injikovat do míst lokalizace prekurzorů PGC, kterými jsou

elektrodenzní granule nuage. V této studii se podařilo nuage lokalizovat na vegetativním pólu oplozené jikry jesetera sibiřského. Můžeme tedy zvolit vegetativní pól jikry jeseterů jako vhodné místo pro injekci fluorescenční sondy. Navíc tento systém diferenciací PGC naznačuje, že UV ozáření vegetativního pólu jikry jesetera, obsahující prekurzory PGC, může způsobit sterilitu jedince, jak bylo již dříve popsáno u *Xenopus laevis* (Züst a Dixon, 1975), která má podobný systém. To by mohlo způsobit komplikace při aplikacích androgenéze, ovšem při cíleném ozáření vegetativního pólu jikry jesetera by se tohoto dalo naopak využít např. pro potřeby sterilizace hosta určeného k transplantaci PGC.

Dalším technickým problémem injekce jikry jeseterů je síla obalů jikry a prakticky nemožnost jejich penetrace skleněnou kapilárou. Toto se dá vyřešit mechanickým odstraněním alveolární vrstvy a zony radiaty externy pomocí pinzet po inkubaci vajíček ve vodě (nepublikovaná data), kde dojde k jejich samovolnému oddálení od vrstvy zona radiata interna, jak bylo popsáno v této studii.

Značené PGC ryb mohou být dále izolovány a využity pro genové banky, kryoprezervaci a následně chimérizaci (Yamaha a kol., 2003). Kryoprezervace rybích gamet je zatím možná pouze u spermií, neboť jikry ryb jsou příliš veliké, obsahují mnoho tuku a mají silné obaly, přes které neproniknou kryoprotektanty. Kryoprezervace PGC je z hlediska konzervační genetiky více efektivní než kryoprezervace spermií. Úspěšnou transplantací třeba jen jediného PGC můžeme za jeden generační interval získat plně vyvinutou a funkční gonádu transplantovaného druhu (Saito a kol., 2008). Navíc je zde uchována i maternální mtDNA. Ta by byla v případě adrogenéze inaktivována společně s genetickou informací jikry.

Tyto výše zmíněné aplikace budou řešeny v našich dalších studiích.

6. LITERATURA

- Aizenshtadt, T.B., Dettlaff, T.A., 1972. Ultrastructure of stellate sturgeon oocytes during maturation 1 Anuulate lamele and Golgi complex. *Sov. J. Dev. Biol.* 3: 220-229.
- Akhundov, M.M., 1988. Early gametogenesis and gonadogenesis in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstadti*). *Brandt. Izvest. Akad. Nauk Azerbaid Ser. Biol. Nauk* 2: 76–81.

- Akhundov, M.M, Fedorov, K.Y., 1991. Early gametogenesis and gonadogenesis in sturgeons, Part 1: On criteria for comparative assessment of juvenile gonadal development in the example of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*). J. Ichthyol. 31: 101–114.
- Akimova, N.V., Malyutin, V.S., Smolyanov, I.I., Sokolov, L.I., 1979. Growth and gametogenesis of the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) under experimental and natural conditions. In the Proceedings of the 7th Japan-Sovietic Joint Symposium on Aquaculture, Tokyo: pp. 179–183.
- Azevedo, C., 1984. Development and ultrastructural autoradiographic studies of nucleolus-like bodies (nuage) in oocytes of a viviparous teleost (*Xiphophorus helleri*). Cell Tissue Res. 238: 121–128.
- Babushkin, N.Y., 1947. Fertility of the Caspian Beluga sturgeon. Zool. Zh. 26: 339-345.
- Berg, L.S., 1948. Fish of fresh waters of the USSR and adjacent countries. Izdatel'stvo Akad. Nauk SSSR, Moscow (in Russian).
- Berg, L.S., Bogdanov, A.S., Kozhin, N.I., Rass, T.S., 1949. Commercial fish of the USSR. Pishchepromizdat, Moscow (in Russian).
- Bounoure, L., 1939. L'origine des Cellules Reproductrices et le Problème de la Lignée Germinale. Paris: Gauthier-Villars.
- Braat AK, Zandbergen T, van de Water S, Goos HJT, Zivkovic D., 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of *vasa* RNA. Dev. Dyn. 216: 153– 167.
- Cherr, G. N., Clark, W.H., 1984. Jelly release in the eggs of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) an enzymatically mediated event. J. Exp. Zool. 230: 145–149.
- Cherr, G.N., Clark, W.H., 1985. An egg envelope component induces the acrosome reaction in sturgeon semen. J. Exp. Zool. 234: 75–85.
- Debus, L., Winkler, M., Billard, R., 2002. Structure of micropyle surface on oocytes and caviar grains in sturgeons. Int. Rev. Hydrobiol. 87: 585–603.
- Debus, L., Winkler, M., Billard, R., 2008. Ultrastructure of the oocyte envelopes of some Eurasian acipenserids. J. Appl. Ichthyol. 24: 57–64.
- Dettlaff, T.A., 1962. Cortical changes in Acipenserids eggs during fertilization and artificial activation. J. Embryol. Exp. Morphol. 10: 1-26.
- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., 1954. The Embryonic Development of Acipenserid Fishes (Stellate Russian and Giant Sturgeon) with to the Problems of their Breeding. Izdatel'stvo Akad. Nauk SSSR, Moscow (in Russian).

- Detlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I., 1993. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and Aquaculture. Berlin, Heidelberg.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Köprunner, M., Dörries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., Raz, E., 2002. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111: 647-659.
- Doroshov, S.I., Binkowski, F.P., 1985. Epilogue: a perspective on sturgeon culture In: Binkowski, F.P., Doroshov, S.I. (Eds.) North American Sturgeons. Dr. W. Junk Publisher, Dordrecht.
- Doroshov, J.N., Moberg, G.P., Van Eenennaam, J.P., 1997. Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Environ. Biol. Fishes* 48: 265–278.
- Eddy, E. M., 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int. Rev. Cytol.* 43: 229–280.
- Esmaili, H.R., Johal, M.S., 2005. Ultrastructural features of the egg envelope of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), (Osteichthyes, Cyprinidae). *Environ. Biol. Fishes* 72: 373–377.
- Gamo, H., 1961. On the origin of germ cells and formation of gonad primordia in the medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn. J. Appl. Entomol. Z.* 13: 101–115.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O., 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). *Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany*, č. 78.
- Ginsburg, A.S., 1959. Oplodotvorení u osetrových ryb. – *Tsitologija* (1) 5: 510–526.
- Ginsburg, A.S., 1961. The block to polyspermy in sturgeon and trout with special reference to the role of cortical granules (alveoli). *J. Embryol. Exp. Morphol.* 9: 173–190.
- Ginsburg, A.S., 1968. Fertilization of fishes and the problem of polyspermy. Moscow, (in Russian), 354 pp.
- Ginsburg, A.S., 1972. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. Israel program for Scientific translation, Jerusalem.
- Ginsburg, A.S., 1987. Egg cortical reaction during fertilization and its role in block to polyspermy. *Sov. Sci. Rev. F. Physiol. Gen. Biol.* 1: 307- 375.
- Godin, I., Wylie, C., Heasman, J., 1990. Genital ridges exert longrange effects on mouse primordial germ cell number and direction of migration in culture. *J. Development.* 108: 357–363.

- Grandi, G., Chicca, M., 2008. Histological and Ultrastructural Investigation of Early Gonad Development and Sex Differentiation in Adriatic Sturgeon (*Acipenser naccarii*, *Acipenseriformes*, *Chondrostei*). *J. Morphol.* 269: 1238–1262.
- Hamaguchi, S., 1985. Changes in the morphology of the germinal dense bodies in primordial germ cells of the teleost (*Oryzias latipes*). *Cell Tissue Res.* 240: 669– 673.
- Hamaguchi, S., 1993. Alterations in the morphology of nuages in spermatogonia of the fish (*Oryzias latipes*) treated with puromycin or actinomycin. *Repris. Nutr. Dev.* 33: 137-141.
- Heasman, J., Quarmby, J., Wylie, C.C., 1984. The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: the source of germinal granule material. *Dev. Biol.* 105: 458–469.
- Houston, D.W., King, M.L., 2000. A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. *Development* 127: 447–456.
- Hugh, S.S.O., 1991. Nutrition and feeding of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): an overview. In: *Acipenser* (Williot, P., ed.), Cemagref, Bordeaux.
- Ikenishi, K., 1998. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev. Growth Diff.* 40: 1–10.
- Kazama-Wakabayashi, M., Yamaha, E., Yamazaki, F., 1999. The elimination and duplication of lower part of blastoderm effects on the number of primordial germ cells in goldfish. *Fish. Sci.* 65: 577–582.
- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A. P., Etkin, L. D., 2001. Mitochondrial ribosomal RNA in the germinal granules in *Xenopus* embryos revisited. *Differentiation* 67: 80-83.
- Kloc, M., Dougherty, M., Bilinski, S., Chan A-P, Brey, E., King, M.L., Patrick, P., Etkin, L.D., 2002. Three dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution in germinal granules in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 241: 79–93.
- Kudo, S., 1980. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Dev. Growth Differ.* 22: 403–414.
- Kudo, S., 1982. Ultrastructure of a sperm entry site beneath the micropylar canal in fish eggs. *Zoological Magazine* 91: 213–220.
- Kudo, S., 1983. Response to sperm penetration of the cortex of eggs of the fish (*Plecoglossus altivelis*). *Dev. Growth Differ.* 25: 163–170.
- Le Menn, F., Pelissero, C., 1991. Histological and ultrastructural studies of the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). In: *Acipenser* (Williot, P., ed.), Cemagref, Bordeaux, pp. 113–128.

- Lin, S., Long, W., Chen, J., Hopkins, N., 1992. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89:4519–4523.
- Mojazi Amiri, B., Maebayashi, M., Adachi, S., Yamauchi, K., 1996a. Testicular development and serum sex steroid profiles during the annual sexual cycle of the male sturgeon hybrid, the bester. *J. Fish Biol.* 48:1039–1050.
- Mojazi Amiri, B., Maebayashi, M., Hara, A., Adachi, S., Yamauchi, K., 1996b. Ovaria development and serum sex steroid and vitellogenin profiles in the female cultured sturgeon hybrid, the bester. *J. Fish Biol.* 48: 1164–1178.
- Nagai, T., Yamaha, E., Arai, K., 2001. Histological differentiation of primordial germ cells in zebrafish. *Zool. Sci.* 18: 215–223.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2006. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103: 2725–2729.
- Omoto, N., Maebayashi, M., Mitsuhashi, E., Yoshitomi, K., Adachi, S., Yamauchi, K., 2001. Histological observations of gonadal sex differentiation in the F2 hybrid sturgeon, the bester. *Fish. Sci.* 67: 1104–1110.
- Omoto, N., Maebayashi, M., Hara, A., Adachi, S., Yamauchi, K., 2004. Gonadal maturity in wild sturgeons *Huso dauricus*, *Acipenser mikadoi* and *A. schrenckii* caught near Hokkaido. *Japan Environ. Biol. Fish.* 70: 381–391.
- Otani, S., Maegawa, S., Inoue, K., Arai, K., Yamaha, E., 2002. The germ cell lineage identified by *vasa*- mRNA during the embryogenesis in goldfish. *Zool. Sci.* 19: 519–526.
- Podushka, S.B., 1993. The variability of the number of micropyles in the eggs of Volga Stellate Sturgeon (*Acipenser stellatus*). *J. Ichthyol.* 33: 152–155.
- Pšenička, M., Rodina, M., Linhart, O., 2010. Ultrastructural study on the fertilisation process in sturgeon (*Acipenser*) function of acrosome and prevention of polyspermy. *Anim. Reprod. Sci.* 117: 147– 154.
- Raz, E., 2002. Primordial germ cell development in zebrafish. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13: 489-495.
- Rochard, E., Williot, P., Castelnaud, G., Lepage, M., 1991. Elements de systematique et de biologie des populations sauvages d'esturgeons. In: *Acipenser* (Williot, P., ed.), Cemagref, Bordeaux (in French with English summary), pp. 475– 507.

- Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue, K., Tanaka, M., Arai, K., Yamaha, E., 2006. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* 50: 691–699.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., Yamaha, E., 2008. Xenogenesis in Teleost Fish Through Generation of Germ-Line Chimeras by Single Primordial Germ Cell Transplantation. *Biol. Reprod.* 78, 159–166.
- Shinomiya, A., Tahala, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Hamaguchi, S., 2000. The *vasa* like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka (*Oryzias latipes*). *Dev. Growth Diff.* 42: 317–326.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., 2001. Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 380–389.
- Timmermans, L.P.M., Taverne, N., 1989. Segregation of primordia germ cells: their numbers and fate during early development of *Barbus conchonioides* (Cyprinidae, Teleostei) as indicated by ³H- thymidine incorporation. *J. Morphol.* 202: 225–237.
- Toury, R., Clerot, J. C., Andre J., 1977. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons teleosteens Cyprinides. IV. Analyse biochimique des constituants du "ciment" intermitochondrial isole. *Biol. Cell* 30: 225-232. (in French with English abstract)
- Van Eenennaam, J.P., Doroshov, S.I., 1998. Effects of age and body size on gonadal development of Atlantic sturgeon. *J. Fish Biol.* 83: 624–637.
- Wakamatsu, Y., Ozato, K., Hashimoto, H., Kinoshita, M., Sakaguchi, M., Iwamatsu, T., Hyodo-Taguchi, Y., Tomita, H., 1993 Generation of germ line chimeras in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 2: 325–332.
- Wallace, R. A., Selman, K., 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electron Microsc. Tech.* 16: 175–201.
- Whittington, P. M., Dixon, K. E., 1975. Quantitative studies of germplasm and germ cells during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 33: 57–74.
- Williamson, A., Lehmann, R., 1996. Germ cell development in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 365–391.
- Williot, P., Brun, R., Rouault, T., Rooryck, O., 1991. Management of female spawners of the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). Brandt: First results In: *Acipenser* (Williot, P., ed.), Cemagref, Bordeaux, pp. 365–380.
- Wylie, C., 1999. Germ cells. *Cell* 96: 165-174.

- Yamaha, E., Kazama-Wakabayashi, M., Otani, S., Fujimoto, T., Arai, K., 2001. Germ-line chimera by lower-part blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. *Genetica* 111: 227–236.
- Yamaha, E., Murakami, M., Hada, K., Otani, S., Fujimoto, T., Tanaka, M., Sakao, S., Kimura, S., Sato, S., Arai, K., 2003. Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell)-containing graft. *Genetica* 119: 121–131.
- Yoon, C., Kawakami, K., Hopkins, N., 1997. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124: 3157–3166.
- Yoshizaki, G. Germ cell transplantation in fish: Basic biology and Applications. In: Book of Abstracts, Satellite International Symposium, Reproductive Biology of Aquatic Organisms. June 30, 2010, Okinawa, Japan: pp. 11.
- Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., Takeuchi, T., 2000. Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 364–371.
- Zelazowska, M., Kilariski W., Bilinski, S. M., Podder, D. D., Kloc, M., 2007. Balbiani cytoplasm in oocytes of a primitive fish, the sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* and its potential homology to the Balbiani body (mitochondrial cloud) of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Tissue Res.* 329: 137–145.
- Zhou, Y., King, M. L., 1996. Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* 122: 2947–2953.
- Züst, B., Dixon, K. E., 1975. The effect of u.v. irradiation of the vegetal pole of *Xenopus laevis* eggs on the presumptive primordial germ cells. *J. Embryo. Exp. Morph.* 34, 1, pp. 209–220.

Lokalizace Balbianiho cytoplasmy jako prekursora primordiálních gonocytů u jiker jesetera během oplození

7. ABSTRAKT

Oocyty mnoha organismů, včetně ryb obsahují tzv. zárodečnou plasmu, což je maternálně děděný determinant zárodečných buněk. Nedávno byla zárodečná plazma v útvaru Balbianiho cytoplasmy previtelogenních oocytů popsána také u jesetera. Ta obsahuje prekuzory zárodečných granulí tzv. nuage,. Zárodečné granule se během embryonálního vývoje objevují jako součást primordiálních gonocytů (PGC) a podle některých studií hrají roli při jejich vzniku. PGC jsou embryonální buňky, ze kterých se v průběhu ontogenéze diferencují gamety. Mají tedy potenciál přenášet genetickou informaci do dalších generací. PGC nebo později spermatogonie tedy mohou být hodnotné pro genové banky a kryoprezervaci, především prostřednictvím produkce gamet získaných chimerizací zárodečných linií.

Prvním krokem pro úspěšnou transplantaci PGC je jejich vizualizace. Ta se provádí většinou injikací GFP (green fluorescent protein) mRNA konjugovaného s mRNA specifickou pro buňky zárodečné linie, tak jako *vasa* nebo *nanos*, do oblasti lokalizace prekursorů PGC (nuage) co nejdříve po fertilizaci jikry.

Elektronová mikroskopie v této studii odhalila tři hlavní obaly jikry (nejsvrchnější alveolární vrstvu, dále vrstvu zona radiata externa a nejspodnější vrstvu zona radiata interna), vrstvu alveolárních granulí u neoplozených jiker a perivitelinní prostor u oplozených jiker; dále pak zárodečnou plasmu s nuage, která byla rozptýlena pouze ve vegetativním pólu ovulované jikry jesetera. Tento poznatek nám umožní nasměrování injikace GFP fluorescenční sondy do oblasti prekursorů PGC jikry jesetera a tím i jejich značení a transplantaci.

Při pozorování jsme navíc během bobtnání jikerných obalů zaznamenali tvorbu volného meziprostoru mezi vrstvami zona radiata externa a zona radiata interna. Jikry jeseterů mají pro injikaci pomocí skleněné kapiláry příliš silné obaly. Oddělením části jikerných obalů (alveolární vrstvy a zona radiata externa) pomocí pinzet, může být injikace sondy usnadněna.

Klíčová slova: Balbiani cytoplasma, chimera, jeseter, jikra, nuage, primordiální gonocyty

Location of Balbani cytoplasm in sturgeon eggs as primordial gonocytes precursor during fertilization

8. ABSTRACT

The oocytes of many organisms, including fish, contain germ plasm. Germ plasm is maternally inherited determinants of germ cells. New-found germ plasm has been also described in previtellogenic sturgeon oocytes as Balbani cytoplasm. It contains precursors of germinal granules so called nuage. Germinal granules have been detected as a part of primordial gonocytes (PGCs) and according to some studies it play the role in the formation PGCs. PGCs are embryonic cells from which the gametes are differentiated. These cells has potential to transmit genetic information to the next generation. PGCs or subsequently spermatogonia therefore have the potential to be of value for gene banking and cryopreservation, particularly via the production of donor gametes with germ–line chimeras.

Nevertheless the first step for successfully transplantation is visualization of PGCs. It is usually done using injection of GFP (green fluorescent protein) mRNA conjugated with mRNA, such as vasa and nanos, to the area of egg with PGC precursor localization (nuage) early after fertilization.

Electron microscopic observation at this study revealed three main principal layers (a topmost alveolar layer, a zona radiata externa and a downmost layer as an zona radiata interna), a layer of cortical granules in unfertilized eggs and a perivitelline space in fertilized eggs; then germ plasm, containing nuage, which was dispersed only in the vegetal pole of ovulated sturgeon eggs.

In addition, we observed formation interspace between the zona radiata externa and zona radiata interna. Sturgeon eggs have too strong envelopes for injection by glass needle. The glass capillary needle penetration could be facilitated by separation of parts of the egg envelopes as the alveolar layer and the zona radiata externa from interspace, which created by separation of the zona radiata externa and zona radiate interna by tweezers.

Key words: Balbani cytoplasm, chimera, egg, nuage, primordial gonocytes, sturgeon