

Osemenění, aktivace, oplození, embryonální a larvální perioda

Náplň přednášky

- Zahrnuje období od smísení gamet po konec larvální periody, tzn. až po období kdy je dovršena metamorfóza jedince.
- Nebude zahrnovat období juvenilní (viz. přednáška diferenciacie pohlaví a první části přednášek spermiogeneze a ovogeneze), adultní (viz. přednáška spermiogeneze a ovogeneze) a období senektivní (tzn. období se sníženou reprodukční aktivitou nebo ztrátou reprodukční aktivity – v akvakultuře staré ryby vždy vyřazujeme z generačního hejna)

Osemenění (inseminace) - smísení gamet



Aktivace gamet

- spermie jsou po aktivaci motilní (je možné opakovat)
- u jiker aktivací nastávají nevratné změny a to růst fertilizačního kónu, kortikální reakce, formování periviteliního prostoru a k bipolární diferenciaci.

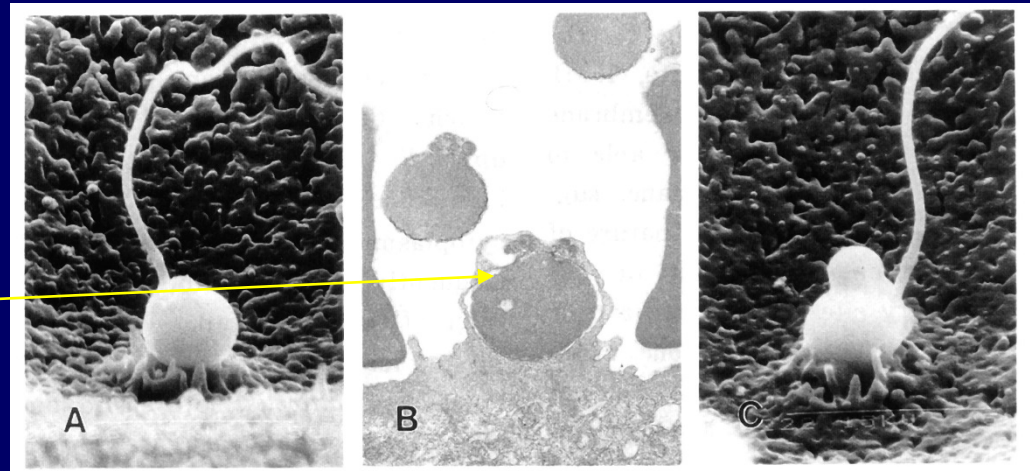
Oplození

je proces následující po aktivaci gamet a je definován jako fúze samčích a samičích prvojader.

Co je počátkem oplození u sladkovodních ryb - období osemenění nebo aktivace gamet ? Je to jednoznačně období aktivace gamet.

Pouze osemenění nestačí k oplození.

Řez hlavičky
spermie v
mikropylárním
otvoru



A-C – spermie pstruha duhová po smísení s jikrami, vlivem rozdílné úrovně iontů a osmotické úrovně ovariální plazmy došlo sice k průniku spermie na dno mikropylárního otvoru, nedošlo ovšem k průniku spermie do vajíčka a k oplození (zygotaci).

Aktivace gamet

- gamety ryb jsou v latentním stádiu v testes a ovariích a u mnoha druhů v semenné plazmě a ovariální plazmě,
- faktory prostředí jako je pH, ionty nebo osmolalita stimulují aktivaci spermií depolarizací buněčné membrány spermií v synchronizaci s aktivací vytřených jiker,
- u převážné většiny sladkovodních kostnatých ryb, začíná aktivace jiker po kontaktu s vodou, přičemž doba pohybu spermií je kratší než doba do uzavření mikropyle.



Vlivem moči dochází ke kontaminaci spermií a jiker a k jejich předčasné aktivaci

3-30 s je obvykle dostatečných k asociaci a fúzi gamet se začátkem embryogeneze u lososovitých, jeseterovitých a kaprovitých ryb

Příklad doby pohybu spermií
lína a uzavírání mikropyle lína

Velocity of spermatozoa movement in tench

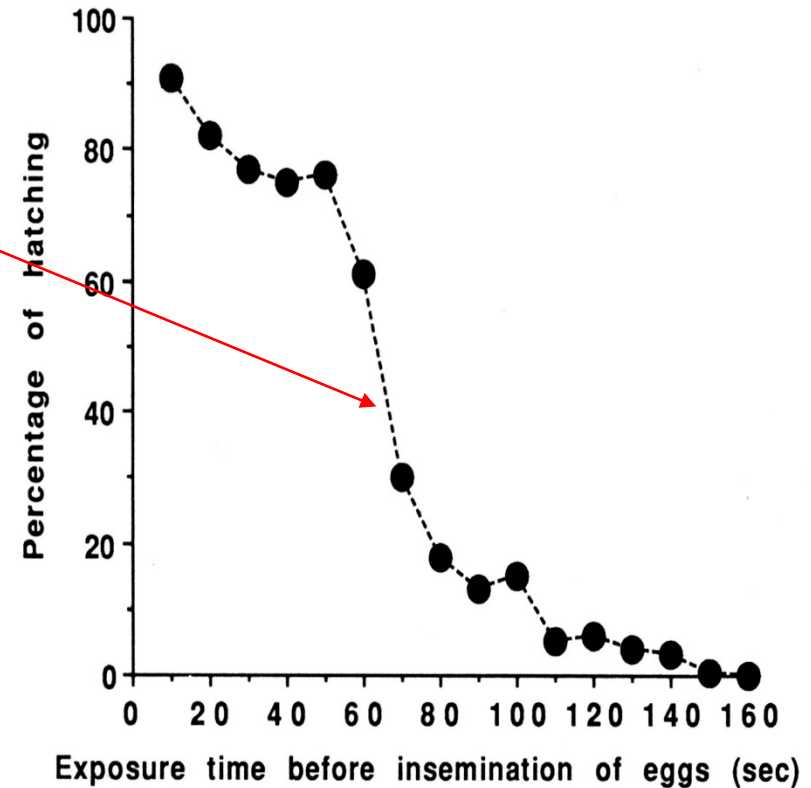
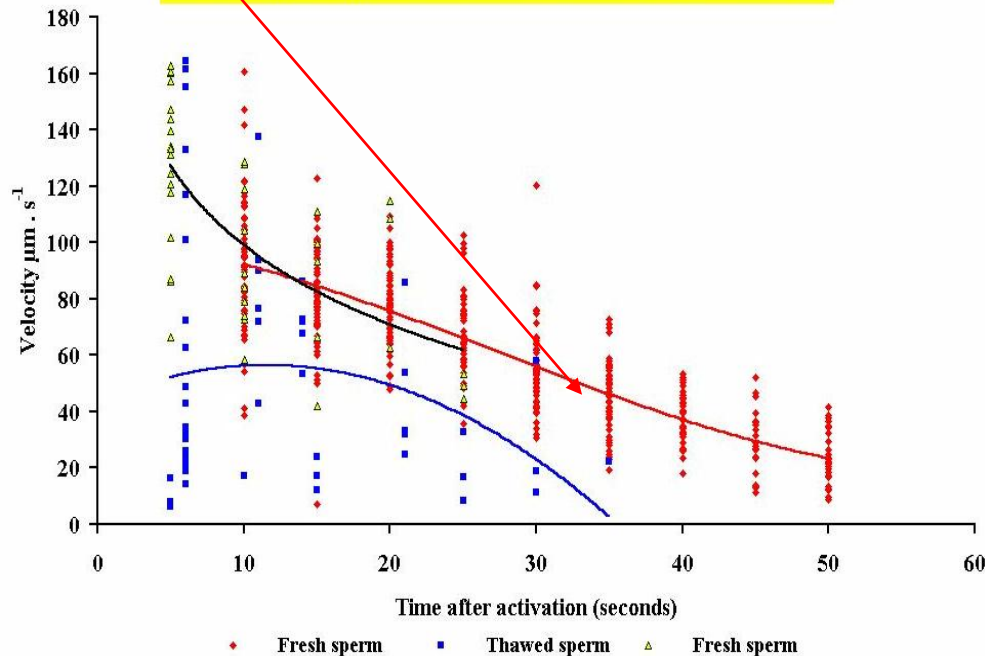
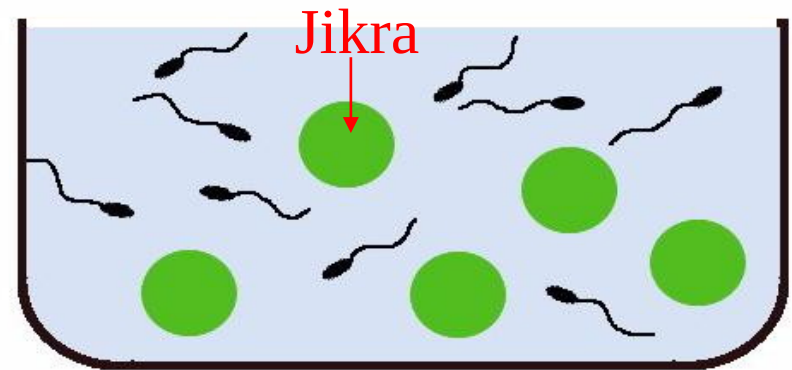


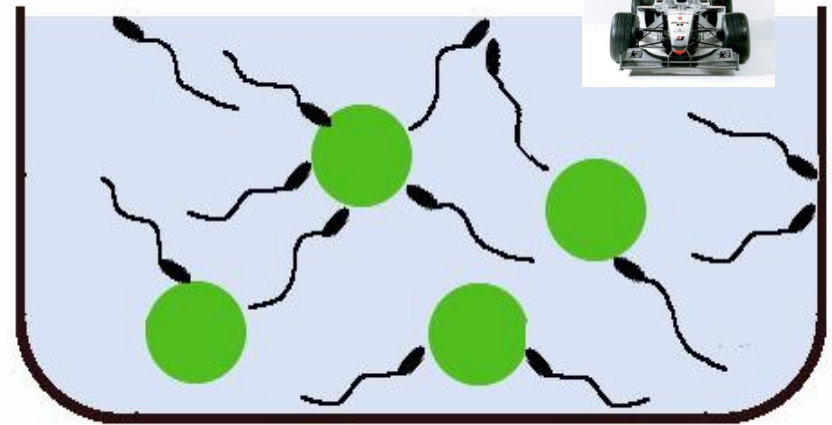
Fig. 10. Changes in the fertilization capacity of eggs exposed to fresh water at 22.5° C (Kouřil *et al.* 1981)

Specificita orientace spermií po aktivaci u převážné většiny ryb

Těsně po aktivaci gamet vodou jsou spermie v celém vodním sloupci



Několik sekund po aktivaci dojde k „dosednutí“ spermií na povrch jikry, mechanickým vlivem a chemotaxí, tzn. atraktivitou mikropylárního otvoru (vysoký obsah iontů a pH) dorazí spermie do mikropyle

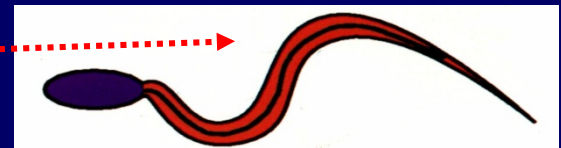
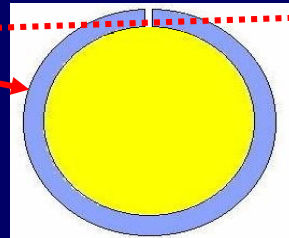
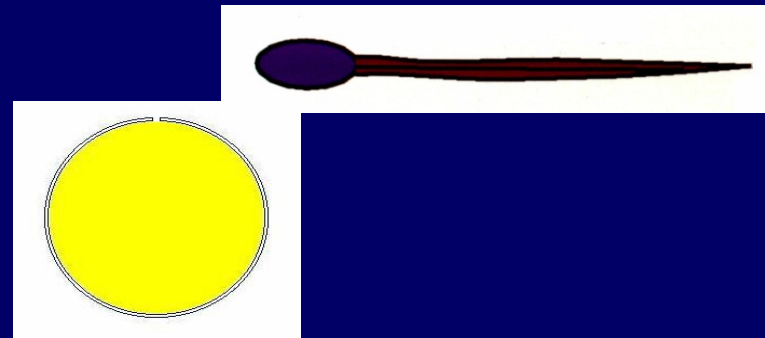


Základní charakterizace aktivace gamet u sladkovodních ryb

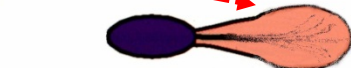
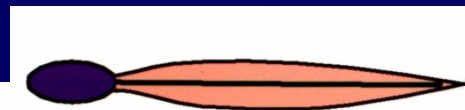
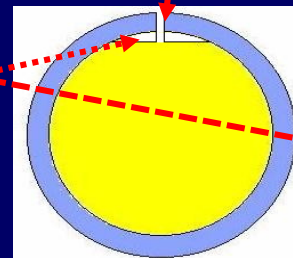
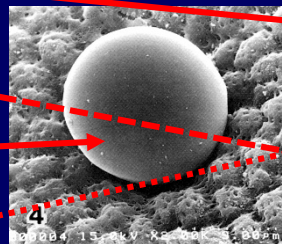
V semenné a ovariální plazmě gamety v latentním stavu (vysoká osmolalita, obvykle 300-400 mOsmol)

↓
Aktivace (průnik vody, interní koncentrace iontů a osmolalita klesá), pohyb spermií, bobtnání jiker

↓
Po 20 s - 6 minutách - stop motility spermií, destrukce bičíku; fertilizační kónus, kortikální reakce u jiker



Průnik spermie



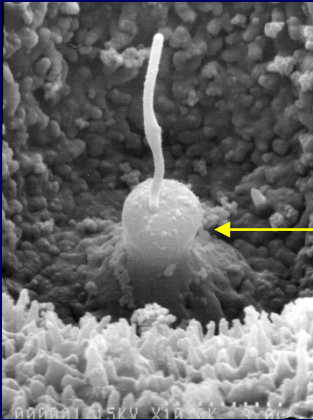
Průnik spermie do jikry

- U ryb s akrozomem dochází k akrozomální reakci především v oblasti mikropyle za účasti vápníku s vyloučením enzymu akrosinu, spiralizaci aktinu, který prochází dosedovým místem mikropyle „klkovité výrůstků“, proniká ovolemou a umožňuje „vtažení“ spermie do jikry.
- U kostnatých ryb je podobný funkční proces bez účasti akrozomu a akrozomové reakce, ale za účasti specilizovaného dosedovitého místa na dně mikropyle „klkovité výrůstky“, které za účasti specifického enzymu umožňují průnik spermie do vajíčka.

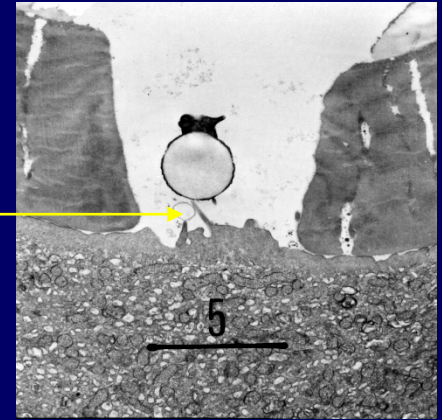
K blokování polyspermie dochází

- Na specializovaném místě na dně mikropyle v místě „klokvitých výrůstků“, určené pouze pro jednu hlavičku spermie.
- Kortikální reakcí se vznikem tzv. perivitelního prostoru, zabrání průniku dalších spermií. Kortikální reakce vzniká od místa průniku spermie.
- Při průniku spermie v místě klkovitých výrůstků dochází k vyhřeznutí cytoplazmy mikropylárním otvorem jehož efektem je vtažení spermie do vajíčka s „ucpáním“ mikropylárního otvoru.

Průnik spermie kapra

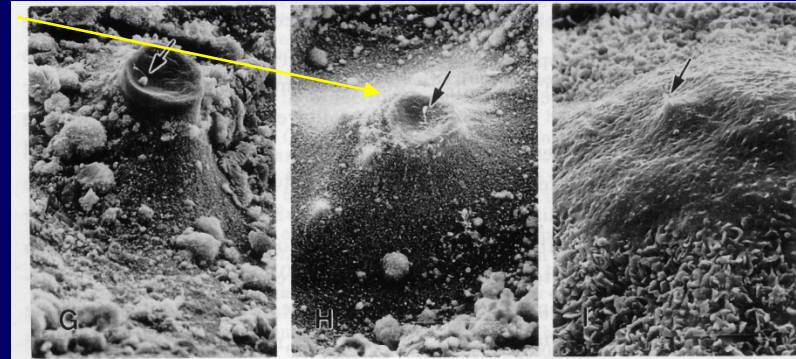
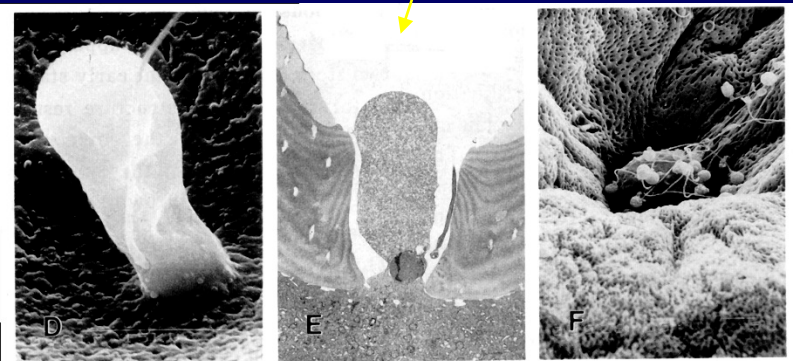


Spermie na dně mikropyle v
místě dosedového místa



Fertilizační konus (vyhřežlá cytoplazma) 30 s po aktivaci, vyplňuje mikropylární otvor

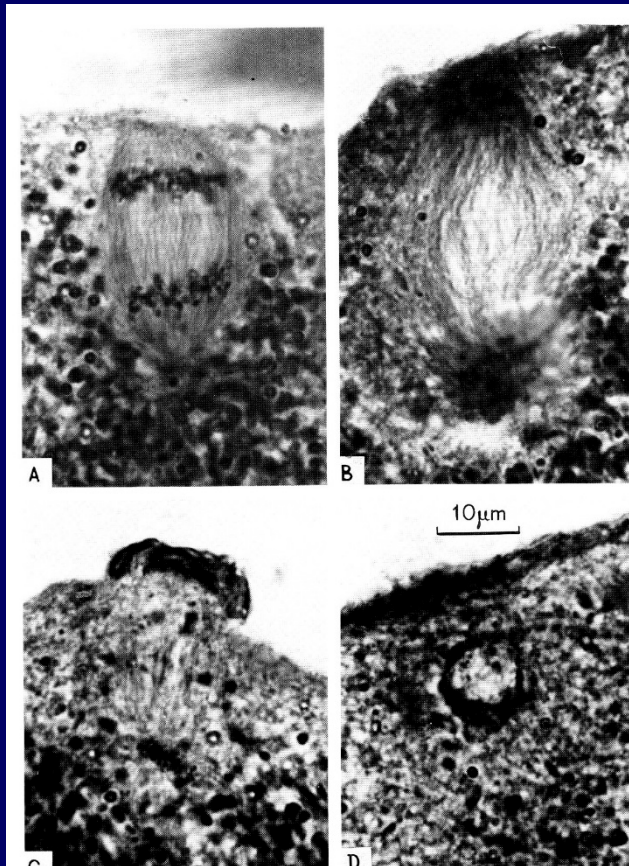
120 s po aktivaci dochází k
vyhřeznutí cytoplazmy v podobě
valu nad úroveň vnějšího obalu
jikry



Těsně po průniku spermie do vajíčka dochází

- Ke změně tzv. vitelinní membrány tzn. obalu vajíčka na tzv. fertilizační membránu;
- Hlavním znakem fertilizační membrány je perivitelinní membrána s tzv. perivitelním prostorem, dále přesun glykoproteinů (z kortikálních granulí) do vnější slizovité vrstvy, které zvyšují jejich ochranu s otevřením velkého množství pórů.
- Následuje „doběhnutí“ II. Meiotického dělení s metafáze/anafáze do telofáze s vytvořením mateřského prvojádra.
- V pozdějším období dochází k zygotaci a prvnímu mitotickému dělení.

Dokončení II. Meiotického dělení, příklad u jeseterů



A – anafáze II – 9-15 min po aktivaci

B – telofáze II – 20 min po aktivaci

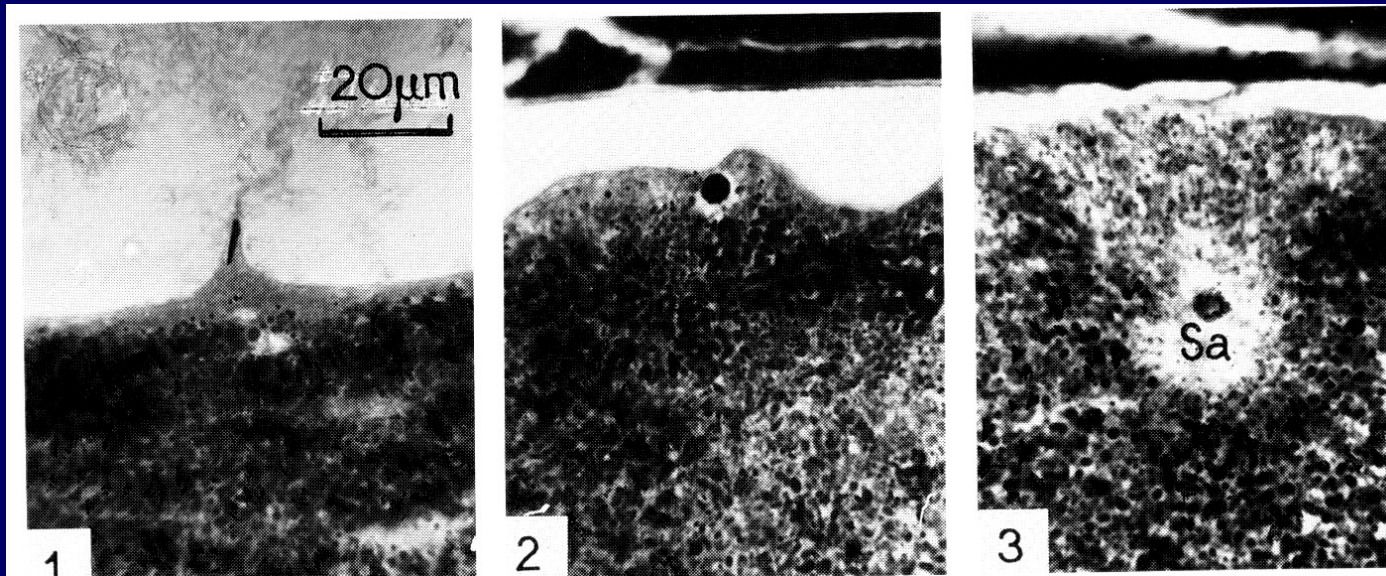
C – oddělení druhého polového
tělíska – v 30 minutě po aktivaci

D – samičí prvojádro v blízkosti
ovolemy – po 30 minutě.

U teplomilných druhů 3-5x rychlejší
průběh.

Průnik spermie příklad u jeseterů

- 1) Průnik spermie mikropylí s vytvářením cytoplazmatického konusu (3 min, $0,06 \tau_0$)
- 2) Formování samčího hvězdicovitého spermatického útvaru (tzv. spermaster), je to útvar před vytvořením samčího prvojádra, 7 min po aktivaci, $0,14 \tau_0$)
- 3) Migrace spermasteru do cytoplazmy (20 min po aktivaci, $0,4 \tau_0$)



Formování spermasteru a zygotace

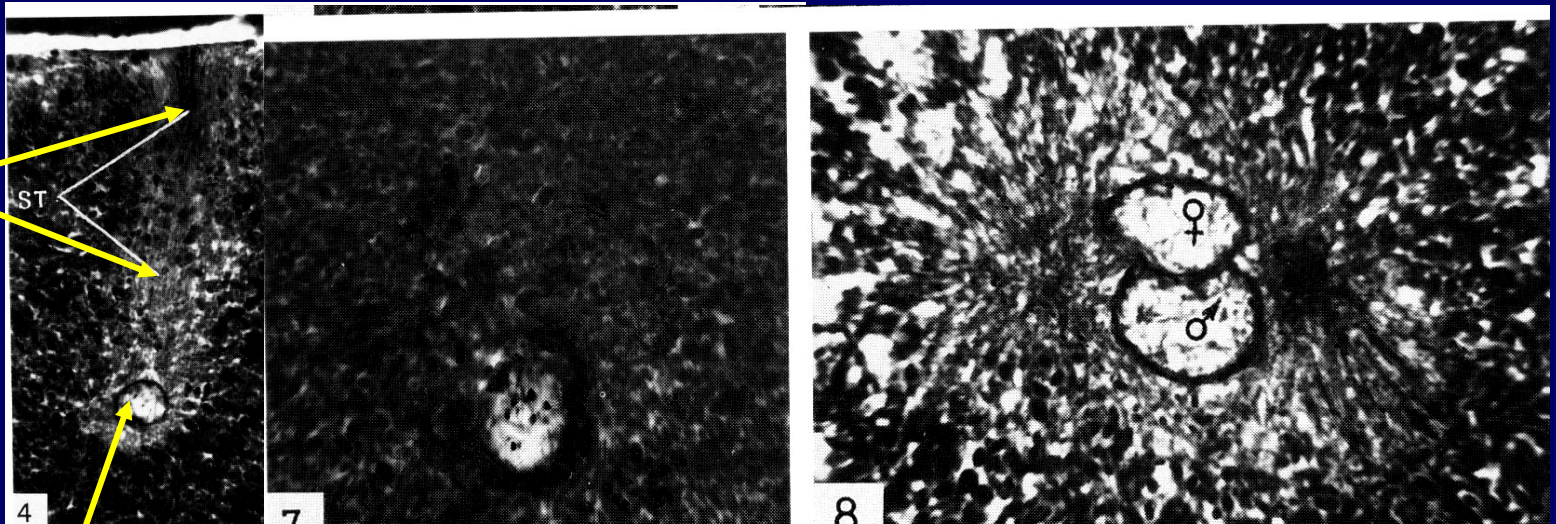
4) spermaster a samičí prvojádro se zvětšuje (1 mikrometr) proniká hlouběji do cytoplasmy, stále je viditelný bičík (migrace až 350 mikrometrů) - 40 minut po aktivaci, $0,8 \tau_0$

7) Spermaster vstupuje do fáze – změny na samčí prvojádru, zvětšuje objem 7x a setkává se samičím prvojádrem, nastává zygotace – 50 minut po aktivaci, $1,0 \tau_0$

8) Prvojádra jsou v těsném kontaktu, dochází k formování profáze mitotického dělení (70 minut po aktivaci, $1,4 \tau_0$; v období $1,2-1,3 \tau_0$ se např. aplikuje šok pro mitotickou gynogenezi, androgenezi či tetraploidizaci)

U kapra dochází k setkání obou prvojader okolo 20 minut při teplotě 20 °C.

Bičík
spermie



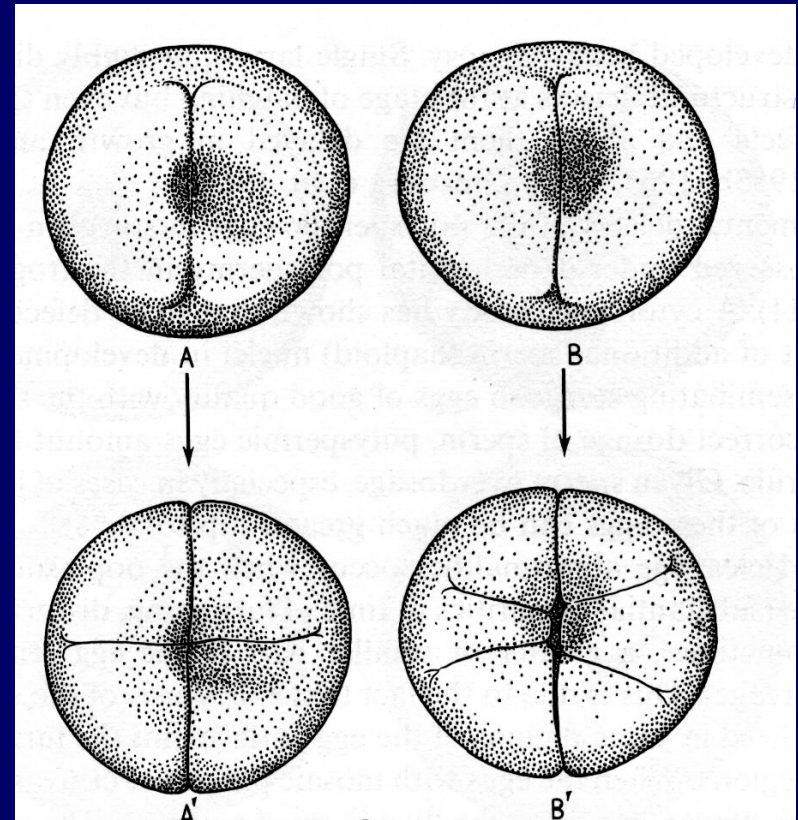
Spermaster

Embryonální perioda rýhování a blastulace

- Po zygotaci nastává perioda „rýhování“ embrya tzn. vytvoření blastodisku, rýhování je tzv. telolecitální „rýhuje“ se část bez žloutku v oblasti animálního pólu – typické pro mnoho druhů ryb, kdy se v průběhu mitotického dělení blastodisk mitoticky dělí s vytvořením maximálního množství buněk (moruly), fáze G1 a G2 v této periodě absentuje.
- V množství zhruba 1000-10000 buněk perioda rýhování přechází do periody blastulace. V této periodě se snižuje úroveň buněčného dělení a končí v pozdním období se vznikem blastodermu.

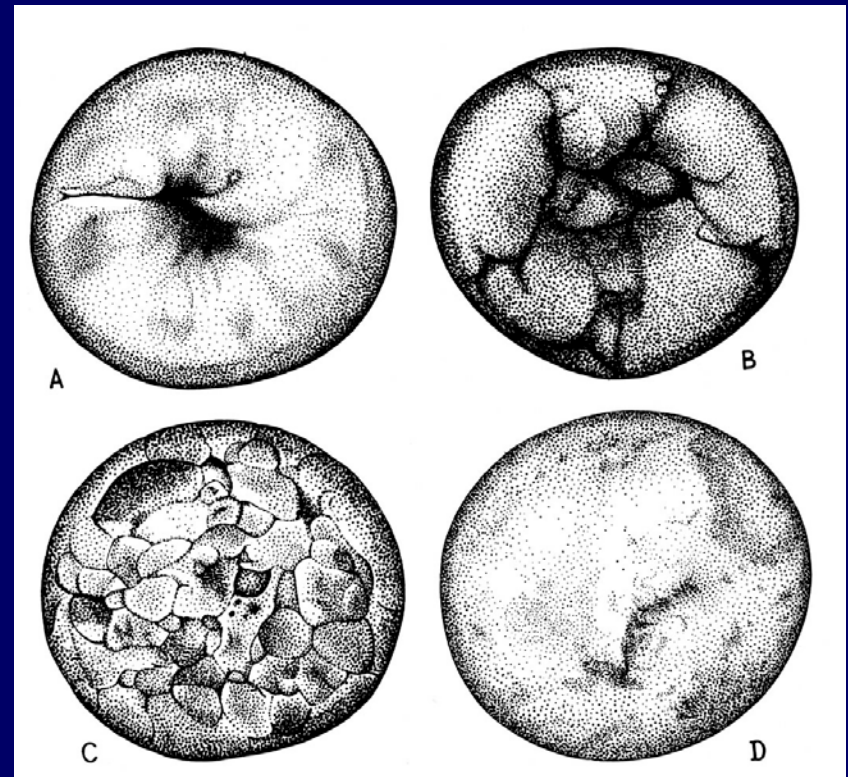
Rýhování vajíčka oplozeného monospermií (A-A') a polyspermnií (B-B') u jesetera

- Výskyt především u jeseterů.
- Výskyt rovněž u kostnatých ryb, ale v menším měřítku.
- Embrya většinou hynou, ale ve velkém měřítku může dojít k vylíhnutí životaschopného plůdku se změnou úrovně DNA.



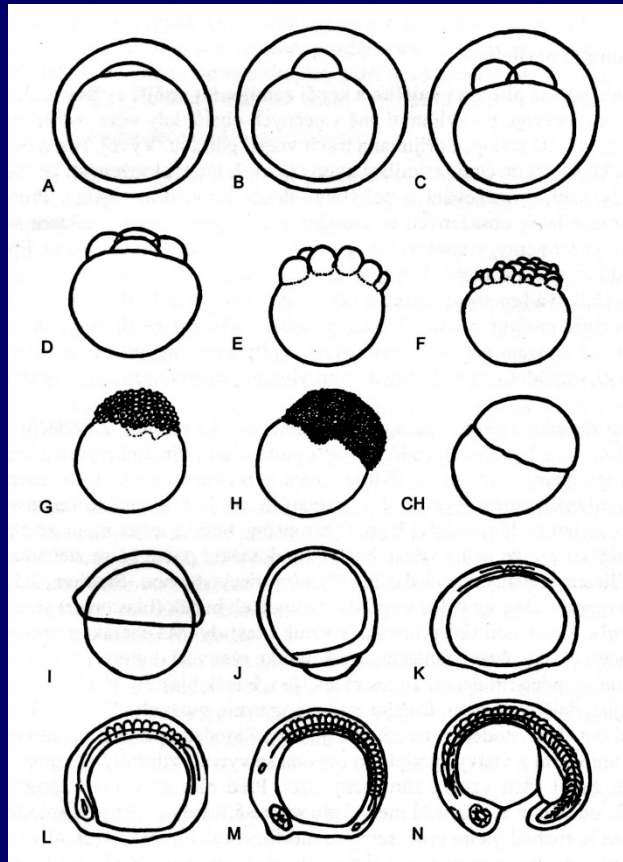
Partenogentické rýhování „neoplozených jiker“ A – začátek, B pozdější perioda, C – limitní stádium, D uhynulá neoplozená jikra, příklad u jesetera

- Tento efekt je známý u mnoha druhů ryb jeseterovitých, ale rovněž i lososovitých, kdy pouze aktivací vodou dojde k rýhování, v 16-32 buňce se rýhování zastavuje.
- Proto počáteční období rýhování do 32 buněk se nemůže přesně chápat jako vhodné období pro měření oplozenosti.

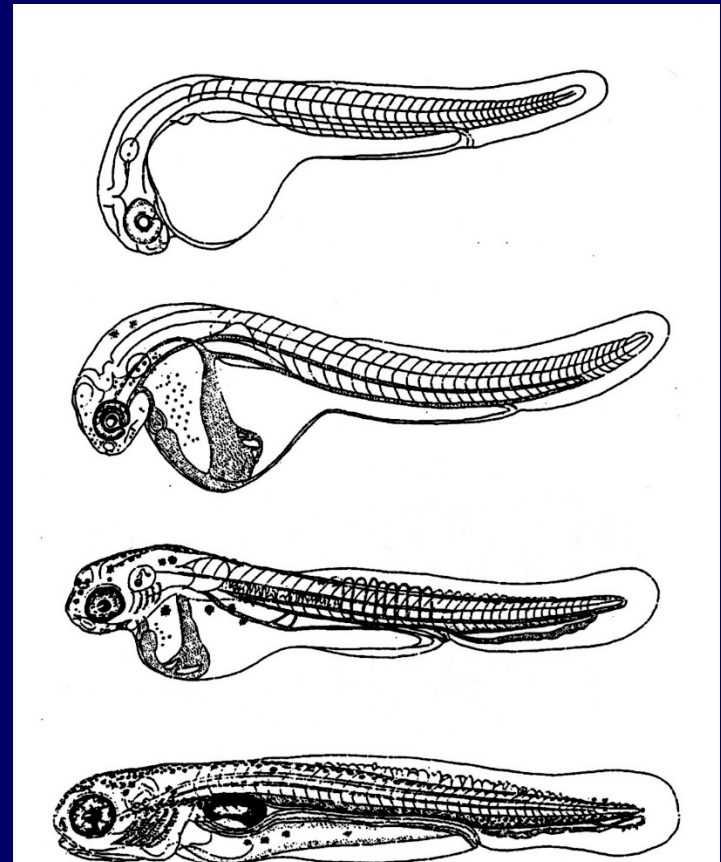


Embryonální perioda u kapra

A,B – blastodisk, C-H – morula,
CH – blastula, I,J – gastrula,
K,N- organogeneze



Stádia po vykulení



Embryonální perioda gastrulace

- Výsledkem jsou tři zárodečné listy vzniklé z blastodermu a to vnější – ektoderm, vnitřní - endoderm a přechodovým mezi listem tzn. mezoderm.
- V průběhu gastrulace je embryonální „buněčný materiál“ přesně lokalizován v místě budoucího tělesného plánu dospělého. Největší díl v této etapě zahrnuje budoucí centrální nervový systém.

Embryonální perioda organogeneze

- Vzniká rudimentární tzn. přechodný orgánový systém zahrnující nervový systém s okem, svalstvo, oběhový systém, exkreční a trávicí systém.
- Perioda nekončí líhnutím plůdku, ale až přechodem embrya na vnější výživu.

Líhnutí embrya v periodě organogeneze

- Pro každá druh je specifické období líhnutí.
- Embrya nedeformovaná se většinou líhnou ve stejném období tzn. v období masivní líhnivosti.
- Líhnivost je způsobena nárůstem líhnoucího enzymu z enzymatické žlázy embrya a růstem embrya. Enzym není druhově specifický a jeho syntéza začíná v období organogeneze a vrcholí v době líhnutí.
- Embryonální periodu od aktivace gamet po vykulení měříme a vyjadřujeme v denních stupních.

Perioda organogeneze po vykulení embrya

- Embryo leží volně nebo je přichyceno na substrátě lepivými žlázami
- Perioda embryonální končí v období přechodu na vnější výživu
- Do prostředí s potravou se embrya (rozplavaný váčkový plůdek – zootechnický výraz) vysazují v období strávení / žloutkového váčku
- Doba do přechodu na vnější výživu je rovněž vyjadřována v denních stupních

Larvální perioda

- Larva je schopna přijímat vnější potravu.
- Perioda larvální končí nahrazením všech dočasných embryo-larválních orgánů orgány definitivními s tělesnou proporcí podobnou dospělci.
- Larvální perioda je druhově specifická (u úhoře larvální perioda – tzv. leptocefalova larva).
- Na konci larvální periody a počátku juvenilní periody dochází k diferenciaci pohlaví.
- Chov v larvální periodě tzn. v přechodu váčkového plůdku na krmený a později rychlený plůdek je součástí sylabů reprodukce jednotlivých druhů ryb.

