

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra zoologie



**Komparativní vývojová morfogeneze
vnějších žaber obratlovců**

Developmental Morphogenesis of Outer Gills in
Vertebrates

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Barbora Crkvová

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

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Roberta Černého, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity. Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a souhlasím s tím, aby byla řádně vedena v evidenci vypůjčovatelů.

v Praze dne 4.5.2012

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Mgr. Robertu Černému, Ph.D., který mě během mého studia trpělivě vedl, poskytoval mi cenné připomínky a především vždy věřil v mé vědecké schopnosti. Také bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře pro studium kraniofaciální evoluce a vývoje za poskytnutí vzorků, zaučení v práci s grafickými programy a konstruktivní kritiku. V neposlední řadě patří velký dík mým rodičům, kteří mi svou bezmeznou podporou umožňují studovat a také mému příteli Jakubovi, který za mnou stojí při všem, do čeho se vrhnu.

Abstrakt

Předmětem této studie jsou přídavné vnější respirační struktury larev obratlovců. Za účelem mezidruhového porovnání těchto struktur byla studována vývojová morfogeneze vnějších žaber u bichira druhu *Polypterus senegalus* a axolotla druhu *Ambystoma mexicanum* a vývoj vnějších žaberních filament u piskoře druhu *Misgurnus fossilis*. K popsání vnějších aspektů vývoje posloužily snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu, pro sledování vnitřní morfologie a pochopení tkáňového kontextu, ve kterém jednotlivé respirační struktury vznikají, byly použity klasické histologické řezy a kryorezy s imunohistochemickým značením. Má data odhalila, že vnější respirační struktury těchto tří druhů jsou pokaždé formovány jiným způsobem. Tyto tři způsoby jsem popsala jako odlišné vývojové módy jejichž vývojová dynamika je pokaždé tvořena odlišnou embryonální vrstvou. Zatímco u piskoře se vnější žaberní filamenta vyvíjejí jako jednoduché protažené výběžky ektodermu, u axolotla jsou vnější žábry generovány aktivitou mezodermu tvořícího svaly a mesenchymu neurální lišty, který dá vznik rozsáhlé pojivové tkáni vyztužující vnější žábry. U bichira bylo překvapivě odhaleno, že vrstvou zodpovědnou za rané formování vnějších žaber je v tomto případě laterálně expandující faryngeální entoderm; tento způsob vzniku pravděpodobně úzce souvisí se specifickým módem gastrulace nalezeným u bichira. Zjištěné rozdíly jsou diskutovány z hlediska odlišností embryonálního vývoje u jednotlivých druhů (vzhledem k jejich fylogenetické vzdálenosti), tkáňového kontextu v době vzniku a rozdílné časné potřeby funkčnosti přídavné respirační struktury. Na závěr představuji různé, v dnešní době diskutované, koncepty homologie s cílem vyjevit jaký typ dat je nezbytný pro konečné posouzení homologie mnou studovaných vnějších respiračních struktur napříč skupinou Anamnia.

Klíčová slova

vnější žábry, vnější žaberní filamenta, faryngogeneze, larvální dýchání, evoluce, homologie, bichir senegalský, piskoř pruhovaný, axolotl mexický

Abstract

This study is focused on external respiratory structures of vertebrate larvae. Developmental morphogenesis of the external gills of Senegal bichir (*Polypterus senegalus*) and Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) was examined together with development of external gill filaments of weather loach (*Misgurnus fossilis*). Scanning electron microscopy was used to describe external aspects of developmental formation of outer gill structures and classic histology and cryosections with immunohistochemical staining helped to understand internal morphology and developing tissue context. My data revealed that external respiratory structures are in each species formed by dissimilar developmental modes which can clearly be characterized by tissue-specific formation. Whereas external gill filaments of weather loach were found to develop as simple filamentous prolongations of outer ectoderm, in the Mexican axolotl instead, major components of external gill formation seem to be mesenchyme of neural crest and mesoderm origin, which differentiate into extensive connective tissue and muscles, respectively. In the Senegal bichir, interestingly, the lateral expansion of the pharyngeal endoderm was found to be responsible for the early formation of the external gills and this mode of formation is probably derived from the specific mode of bichir gastrulation. These differences are discussed with respect to specific embryonic development, specific tissue context and different timing and need of functionality of particular structures of each species. Finally several concepts of homology that are widely discussed today are introduced, to manifest what kind of data is necessary for final assessment of homology of external respiratory structures across lower vertebrates.

Key words

external gills, external gill filaments, pharyngogenesis, larval respiration, evolution, homology, Senegal bichir, Mexican axolotl, weather loach

Obsah

Obsah.....	6
1 Úvod	7
2 Shrnutí dosavadních poznatků	9
2.1 Vnější žábry obojživelníků (Amphibia).....	9
2.1.1 Anura.....	9
2.1.2 Caudata.....	12
2.1.3 Gymnophiona	14
2.2 Vnější žábry dvojdyšných ryb (Dipnoi).....	15
2.2.1 Lepidosireniformes	16
2.2.2 Ceratodontiformes.....	17
2.3 Vnější žábry bichirů (Polypteriformes).....	18
2.4 Vnější žaberní filamenta paryb (Chondrichthyes).....	19
2.5 Vnější žaberní filamenta paprskoploutvých ryb (Actinopterygii).....	20
3 Materiál a metody.....	22
3.1 Embrya	22
3.2 Skenovací elektronová mikroskopie	22
3.3 Histologické řezy	23
3.4 Kryostatové řezy a imunohistochemické barvení.....	23
3.5 Projasněné preparáty celých jedinců.....	24
3.6 Značení populace buněk neurální lišty.....	24
3.7 Zpracování dat	25
4 Seznam použitých zkratk	26
5 Výsledky	28
5.1 <i>Polypterus senegalus</i>	28
5.1.1 Vnější morfologie (SEM).....	28
5.1.2 Histologie (JB-4).....	29
5.1.3 Imunohistochemické značení	31
5.1.4 Projasněné preparáty celých jedinců.....	33
5.2 <i>Ambystoma mexicanum</i>	44
5.2.1 Vnější morfologie (SEM).....	44
5.2.2 Histologie (JB-4).....	45
5.2.3 Značení populace buněk neurální lišty.....	46
5.3 <i>Misgurnus fossilis</i>	56
5.3.1 Vnější morfologie (SEM).....	56
5.3.2 Histologie (JB-4).....	57
6 Diskuze	68
6.1 Vnější žábry bichirů (Polypteriformes).....	68
6.2 Vnější žábry Tetrapod	73
6.3 Vnější žaberní filamenta.....	76
6.4 Problematika homologie	79
7 Závěr	84
8 Seznam použité literatury.....	86
9 Příloha 1	92
9.1 Abstract of the talk for the meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology, 2012 in Lisbon.....	92

1 Úvod

Larvy obratlovců odjakživa přitahovaly pozornost evolučních biologů, ať už pro obrovskou diverzitu svých forem, nebo naopak fascinující podobnost adaptivních struktur u fylogeneticky vzdálených druhů. Oba tyto protichůdné trendy jednoznačně vypovídají o tom, že larvální stádia a jejich znaky jsou samostatnou odpovědí na selekční tlaky, které působí odděleně jak na dospělé, tak právě i na jeho larvu (Hart, 2003; Duellman & Trueb, 1986). Za jeden z adaptivních znaků larev, vyvinutých v reakci na podmínky okolního prostředí, lze považovat i vnější žábry.

Na první pohled nás upoutá velká podobnost vnějších žaber, objevujících se vesměs u všech skupin obratlovců, majících vodní larvu. Typickými a nejnámějšími nositeli vnějších žaber jsou obojživelníci (Amphibia), nápadně podobné respirační struktury mají ale i bahníci (Dipnoi) a také skupina bichirů (Polypteriformes) (Goodrich, 1909; Goodrich, 1958; Gegenbaur, 1878, Rauther 1937; Witzmann, 2004), patřící mezi paprskoploutvé ryby (Patterson, 1982; Gardiner et al., 2005). Přes znalost povrchové morfologie a základní stavby hotových, finálních struktur (Schmalhausen, 1968; Budgett, 1901; Budgett, 1901c; Kerr, 1903), se nikdy nepodařilo vnější žábry přesvědčivě homologizovat (Witzmann, 2004). Hlavním důvodem je neexistence dokladů (recentních či fosilních), které by nasvědčovaly tomu, všechny tři skupiny mající vnější žábry, zdědily tyto struktury od společného předka, který je měl. Další odlišnosti hrající proti teorii homologie, kdy za homologické považujeme stejné struktury mající stejnou funkci u různých organismů (*sensu* Owen, 1843; podle Wake, 2003), jsou potom v počtu párů vnějších žaber u jednotlivých linií a způsobu uchycení k žaberním obloukům.

Koncept homologie se však od dob svého vzniku změnil a věda dnes tuto problematiku studuje daleko komplexněji, kromě homologie a konvergence rozlišujeme v kontinuu mezi nimi například hlubinnou homologii nebo paralelismus (Hall, 2012; Shubin, 2009; Scotland, 2010). Ukazuje se proto, že pro odhalení evoluční historie je nutné detailně studovat mechanismus vývoje a možné geny stojící v pozadí tohoto vývoje.

Ve své diplomové práci jsem se proto pokusila co nejdetailněji popsat morfogenezi raného vývoje vnějších žaber u bichira druhu *Polypterus senegalus*, zástupce paprskoploutvých ryb, který stojí jako jediný nositel vnějších žaber mimo Sarcopterygní linii. Jako srovnávací organismus byl určen axolotl druhu *Ambystoma mexicanum*, zastupující ocasaté obojživelníky, u kterých při neotении zůstávají vnější žábry funkční po celý život.

V literatuře najdeme zmínky ještě o jedné přídatné respirační struktuře vodních larev obratlovců a tou jsou takzvaná vnější žaberní filamenta (z ang. „external gill filaments“). Nachází se u embryí paryb a larev paprskoploutvých ryb a byla vždy odlišována od pravých vnějších žaber (Goodrich, 1909; Goodrich, 1958). Jejich vývoj je stejně jako u vnějších žaber popsán spíše obecně, z vnějšího pohledu (Wyffels, 2009; Kryžanovskij, 1949; Kostomarova, 1991). Proto jsem si pro svou studii vybrala navíc k zástupcům s vnějšími žábry ještě nositele vnějších žaberních filament, piskoře druhu *Misgurnus fossilis*.

Tato komparativní práce si klade za cíl co nejdetailněji popsat ranou morfogenezi a histologii vnějších respiračních struktur těchto tří druhů v kontextu faryngeální oblasti, vyjádřit se k popsáním odlišnostem a korelovat tato data s druhově specifickými aspekty embryonálního vývoje u jednotlivých druhů. Podrobná analýza těchto dat mi nakonec umožňuje vyjádřit se k úrovním homologie vnějších respiračních struktur.

2 Shrnutí dosavadních poznatků

Účelem této kapitoly je podrobné seznámení se strukturou nazývanou vnější žábry. Jedná se o adaptaci časných ontogenetických stádií nižších obratlovců (Anamnií), kterou si tyto embrya a larvy vyvinuly v odpověď na selekční tlaky prostředí s nižší dostupností rozpuštěného kyslíku. Ať už se jedná o orgán příjmu kyslíku z vody, nebo z prostředí ve vajíčku či uvnitř matky, je výsledná struktura vždy velmi podobná. Větvené i nevětvené výběžky, vyrážející po stranách za hlavou v oblasti branchiálních oblouků, jsou hustě prokvrvené a na povrchu pokryté tenkou vrstvou epidermis.

Přes četné podobnosti však najdeme i mnohé rozdíly a následující přehled by měl napříč fylogenetickým systémem vyjevit diverzitu struktur, které nazýváme vnějšími žábry a poukázat na podobná přizpůsobení v liniích, kde bychom vnější žábry nehledali.

2.1 Vnější žábry obojživelníků (Amphibia)

Obojživelníci, jakožto skupina s často nepřímým vývojem, probíhajícím ve vodním prostředí, jsou typickými a nejznámějšími obratlovci s vnějšími žábry. Vývojové stádium nesoucí vnější žábry najdeme u velké většiny druhů ve všech třech evolučních liniích. Většina výzkumu zameraného na vnější žábry byla provedena na obojživelnících.

2.1.1 Anura

V linii zahrnující dnešní evolučně vysoce specializované zástupce žab, se žábry nalézají hned ve dvou formách – žábry vnější a žábry vnitřní. V obou případech se jedná o novotvary vzniklé v evoluci *de novo*. Linie vedoucí k obojživelníkům totiž žábry, tak jak je známe od ryb, ztratila; pojem „vnitřní“ žábry tak odkazuje pouze na společnou topografii s rybími žábry, nikoliv na jejich společný původ (Rauther, 1937, Gegenbaur, 1901).

Pojmy „vnitřní“ a „vnější“ žábry můžou být u spousty druhů značně zavádějící. Podle nejrozšířeněji používané vývojové tabulky (kterou budu i dále používat) popsané na druhu *Bufo valliceps* (Gosner, 1960), totiž struktury

pozičně odpovídají svému pojmenování pouze ve stádiu 23-24. V době, kdy už můžeme pozorovat žábry „vnitřní“ a zároveň celá oblast ještě není překryta operkulárním záhybem, jsou totiž „vnitřní“ i „vnější“ žábry jasně ven prominující, a tudíž není jasné, které jsou ty vnější (Viertel & Richter, 1999). Viertel proto ve své předchozí studii (Viertel, 1991) zavádí pro žaberní struktury žab výstižnější označení – dočasné a přetrvávající žábry. Dočasnými žábami nazývá strukturu situovanou laterálně od faryngu, zakládající se ve stádiu 18, která po vylíhnutí z velké části resorbuje (stadium 23-25) a zbytek přerůstá operkulárním záhybem. Za přetrvávající žábry označuje respirační strukturu situovanou ventrálně, která je jasně pozorovatelná zhruba od stádia 22 a po uzavření operkulárních záhybů a resorbci dočasných žaber slouží larvě k dýchání až do metamorfózy. Operkulem je u žab nazýván pouze záhyb epidermis, který nemá nic společného s pravým osifikovaným operkulem u ryb (Witzmann, 2004).

Ačkoliv u žab popisujeme dvě larvální dýchací struktury a máme pro ně dva různé názvy, mají toho mnoho společného a na jejich vývoj se dá nahlížet jako na komplexní přeměnu jedné struktury ve druhou. Dočasné žábry začínají jako embryonální epidermální výběžky, které se postupně prodlužují a větví až do své maximální velikosti. Během vývoje dočasných žaber začíná vznikat jejich ventrální výchlipka, z které později vzniknou přetrvávající žábry. Od stádia 23 počíná regrese dočasných žaber a jejich postupné přerůstání operkulárním záhybem, při němž dojde k překrytí (a tedy internalizaci) i jejich ventrální výchlipky – přetrvávajících žaber (Viertel & Richter, 1999; Schmalhausen, 1968; E.Gerhardt, 1932; podle Duellman & Trueb, 1986). Jelikož jsou „vnitřní“ žábry žab embryonálně odvozené od těch „vnějších“ dočasných, které vznikly v linii obojživelníků *de novo*, nemůžou být homologní (*sensu* Lankester, 1870 – zděděné od posledního společného předka; podle Wake, 2003) vnitřním žábrám ryb (Witzmann, 2004).

Taxon Anura zahrnuje přes pět a půl tisíce druhů, patřících do bezmála čtyřiceti čeledí. A tak jako najdeme obrovskou diverzitu v morfologii adultních forem, i žábry jejich nedospělých stádií jsou velmi diverzifikované. Pro obojživelníky je původní počet 3 páry dočasných žaber (Duellman & Trueb, 1986; Witzmann, 2004), a tak to najdeme i u žab, často však dochází k druhotným redukcím posteriorních párů a dokonce mohou dočasné žábry chybět úplně (například u čeledi Eleutherodactylidae). U druhů, kde se dočasné

žábry vyskytují, se tyto zakládají většinou od stádia 18, ale u některých žab s přímým vývojem (z čeledi Hemiphractidae) můžeme dokonce dočasné žábry pozorovat už od stádia 15-16 (pozdní neurulace). Ať už v jakémkoliv stádiu, zakládají se dočasné žábry jednotlivě jako polokruhovitá primordia laterálně za hlavou, odpovídající jednotlivým obloukům faryngeálního vyztužení, což jsou v případě obojživelníků branchiální oblouky I-III. Každé primordium se dále prodlužuje a postupně větví až do své maximální délky kolem stádií 20-21. Ve stádiu 22 začíná vznikat ventrální výchlipka dočasných žaber (budoucí přetrvávající žábry), která se vyvíjí dále, zatímco dočasné žábry se začínají od stádia 23 resorbovat a překrývá je postupně rostoucí operkulární záhyb. Překrytí probíhá asymetricky tak, že nejdříve jsou plně zakryty žábry na pravé straně a překrytí na levé straně je dokončeno až ve stádiu 25. Od té doby dále fungují jako respirační struktura (až do metamorfózy ve stádiu 45) přetrvávající žábry; těch se vyvíjejí 4 páry u pulců všech žab, kromě čeledí Pipidae a Rhinophrynidae (Orton, 1953), a kromě žáby rodu *Ascaphus* (De Saint-Aubain, 1985). Ačkoliv dočasných žaber tedy mohou být 0-3 páry, přetrvávajících (pokud jsou) jsou vždy 4 páry.

Na povrchu dočasných žaber najdeme dvě vrstvy epidermálních buněk - peridermis a sensorickou vrstvu. V povrchové vrstvě můžeme najít tři buněčné typy – ploché dlaždicovité buňky zbrázděné mikrokly, obrvené buňky s ciliemi a nejméně početné oválné buňky bohaté na mitochondrie (z ang. Mitochondria Rich Cells) (Brunelli et al., 2004; Uchiyama a Yoshizawa, 1992). Pod nimi se nachází vrstva dermis a vnitřek je tvořen pojivovou tkání a ojediněle buňkami faryngeálního entodermu. Viertel (Viertel, 1991) proto pro tuto oblast používá pojem ekto-entodermální přechodná zóna. Do vnitřku žaber pronikají cévy zřejmě mezodermálního původu, odvozené od jednotlivých aortálních oblouků (III-VI) odstupujících z truncus arteriosus. Neokysličenou krev přivádějí afferentní branchiální arterie, které se větví v hustou síť kapilár pronikajících do jednotlivých filament a okysličenou krev zpět do těla do aorty dorsalis odvádějí efferentní branchiální arterie (Viertel & Richter, 1999; De Saint-Aubain, 1985). Zvláštností cévního zásobení u pulců žab jsou mostní spojky, od kterých odstupují kapilární smyčky do jednotlivých filament, které tak lze úplně vyřadit z krevního oběhu (De Saint-Aubain, 1981). Celá struktura je pak pomocí svalů *mm. constrictores branchiales* připojena k ceratobranchiale příslušného

žaberního oblouku (Cannatella, 1999). V případě třech párů se jedná o branchiální oblouky I-III, u druhů, kde se žábry redukují, mizí nejdříve pár na III., a poté na II. ceratobranchiale (Duellman & Trueb, 1986). Inervace je zajištěna IX. (*n. glossopharyngeus*) a X. (*n. vagus*) hlavovým nervem (Schlosser a Roth, 1995).

Nejrozsáhlejší a jediné větší srovnání vývoje dočasných žaber, především z hlediska počtu párů, délky filament a hustoty obrvených buněk, provedli Nokhbatolfoghahai a Downie (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2008). U čeledi Bufonidae lze většinou nalézt 2 páry vnějších žaber s kratšími filamenti a střední hustotou obrvených buněk. Zástupci čeledi Eleutherodactylidae mají přímý vývoj a dočasné žábry nemají buď vůbec, a nebo pouze ve formě malých výrůstků se spekulativní funkcí (Thibaudeau a Altig, 1999). Respirační funkci u nich přebírají jiné, hustě prokrvené části těla. Žáby v čeledi Hemiphraactidae inkubují vajíčka na svých zádech a jejich pulci si vyvinuli specializované dočasné žábry. Tyto mají zvonovitý tvar a uzavírají embryo spolu se žloutkovým váčkem do „extraembryonálního“ vaku, který se vyplní tekutinou, přes kterou potom probíhá výměna plynů. Vak může vznikat z jednoho páru a nebo fúzí ze dvou párů (Duellman & Trueb, 1986; Del Pino & Escobar, 1981). V čeledi Hylidae najdeme velkou diverzitu dočasných žaber od krátkých málo obrvených, po dlouhé hustě větvené. Párů najdeme většinou 2 až 3. V největší čeledi Ranidae se skoro 1500 druhů mají pulci velmi diverzifikované dočasné žábry (Nokhbatolfoghahai & Downie, 2008).

2.1.2 Caudata

Vnější žábry jsou pro ocasaté obojživelníky natolik charakteristický a klíčový larvální znak, že na nich bylo provedeno mnoho nejrůznějších studií. Obecně platí, že vnější žábry nalezneme u larválních stádií všech ocasatých, kteří larvu mají a u druhů s přímým vývojem je nositelem tohoto znaku embryo. Výhodou ocasatých pro výzkum této problematiky je i neotenie, která prodlužuje existenci některých larválních struktur. Neotenie je takový jedinec, u kterého se somatické a pohlavní orgány vyvíjejí rozdílnou rychlostí. To způsobí ustrnutí ve stádiu larvy se zachovanými larválními znaky (vnější žábry, larvální zuby, funkční postranní čára, absence očních víček), ale plně vyvinutými pohlavními orgány, umožňujícími rozmnožení (Pough et al., 2004). Neotenie může být

fakultativní i obligatorní, a i stupeň do kterého případně dojde metamorfóza je pro jednotlivé druhy specifický.

Napříč druhy najdeme velmi diverzifikované vnější žábry a bylo dokázáno, že tento znak velmi dobře odpovídá tlakům okolního prostředí, ve kterém se larva daného druhu nachází. Na příkladech zástupců tří rodů byly posány 3 odlišné larvální typy (Valentine & Dennis, 1964). Rod *Rhyacotriton* (Rhyacotritonidae), vyvíjející se v rychlých horských potocích s velkým množstvím dostupného kyslíku, má krátké žábry s jedinou řadou filament. Druhý typ zastoupený rodem *Gyrinophilus* (Plethodontidae) se vyvíjí v proudících vodách řek a má delší vnější žábry s již dvěma řadami filament. Třetí typ zastupuje rod *Ambystoma* (Ambystomatidae), jehož larva se vyvíjí ve stojatých vodách s malou dostupností kyslíku a její vnější žábry jsou křovitého vzhledu s velkým počtem filament ve dvou řadách i mezi nimi. Toto srovnání ukazuje, že vnější žábry, jakožto epidermální struktura s přímým kontaktem s vnějším prostředím, jsou znak evolučně velmi plastický a jejich evoluce je napříč fylogenetickými liniemi tažena právě ekologickými nároky (Valentine & Dennis, 1964). Vnější žábry jsou ale plastickým znakem i v rámci jednoho druhu, nebo dokonce jednoho jedince, jak dokazuje série pokusů provedená na družích *Ambystoma jeffersonianum*, *A. opacum* a *Salamandra maculosa* (Bond, 1960) a studie na *Necturus maculosus* (Guimond & Hutchison, 1976; podle Witzmann, 2004). Larvy vystavené změně v koncentraci kyslíku byly už po týdnu schopné reagovat změnou velikosti vnějších žaber, počtu filament a tvaru buněk.

Obecně nalezneme vnější žábry u ocasatých obojživelníků vždy v počtu tří párů, připojujících se na ceratobranchialia I.-III. branchiálního oblouku (Duellman a Trueb, 1986; Witzmann, 2004). Z jednotlivých základů začnou vyrůstat jednotlivé hlavní stonky, na kterých se postupně objevují dvě řady filament, alternativně mohou být přidány ještě třetí a čtvrtá řada. Délky filament jsou druh od druhu různé (Witzmann, 2004). V povrchové vrstvě nacházíme stejně jako u žab tři buněčné typy – ploché buňky, obrvené buňky a buňky s vysokým počtem mitochondrií (Lewinson et al., 1987). Specifikem cévního zásobení vnějších žaber u ocasatých obojživelníků je absence V. aortálního oblouku (III. branchiální aortální oblouk) u některých druhů (např. *Siren lacertina*, *Necturus maculosus* – Darnell, 1949). Jeho funkci zásobení třetího

páru vnějších žaber (původní stav se čtyřmi aortálními oblouky je zachován např. u *Ambystoma mexicanum* – De Saint-Aubain, 1985; Malvin, 1983; podle De Saint-Aubain, 1985), potom přebírá VI. aortální oblouk, od kterého zároveň odstupuje i budoucí plicní tepna. Stavba branchiálních aortálních oblouků je stejná jako u žab, s tím rozdílem, že mostní spojky zde najdeme na bázi hlavního stonku vnějších žaber a další distálněji (spojují afferentní a efferentní br. arterii) a ne při odstupu kapilár do jednotlivých filament (De Saint-Aubain, 1985; Darnell, 1949). Tyto mostní spojky hrají důležitou roli při metamorfóze, kdy odříznutí vnějších žaber od cévního zásobení vede k jejich regresi. Hlavní stonek je k posteriornímu okraji příslušného ceratobranchiale připevněn pomocí svalů *mm. depressores branchiarum* a k hornímu konci ceratobranchiale pomocí *mm. retractores branchiarum* (Schmalhausen, 1968). Tyto svaly dohromady umožňují celou strukturou hýbat, a tak zajišťovat dostatečné množství kyslíku pro respiraci (vlastní pozorování).

Přehled taxonů s popisem jejich vnějších žaber zde neuvádím, protože vzhledem ke značné plasticitě daného znaku nekoreluje strukturní podobnost a stupeň vyvinutosti vnějších žaber s fylogenetickou příbuzností daných druhů.

2.1.3 Gymnophiona

Nositelem vnějších žaber jsou u červorů embrya (Duellman & Trueb, 1986); u larválních stádií tyto dýchací struktury běžně nepřetrvávají, avšak Wake pozoroval rudimenty vnějších žaber u larev druhů *Epicrinops petersi* a *E. bicolor* (Wake, 1969). Bohužel jsou červoři z obojživelníků úplně nejméně prostudovanou skupinou a pro jejich embrya to platí dvojnásob. Z toho co je známo, ale vyplývá, že i u nich nalezneme 3 páry vnějších žaber, tak jak je typické pro obojživelníky.

Vývoj vnějších žaber byl detailněji popsán na *Ichthyophis kohtaoensis* z čeledi Ichthyophiidae (Dünker et al., 2000). První náznaky ve formě zduřenin po stranách hlavy, odpovídajících ceratobranchialním I.-III., můžeme pozorovat v autory popsaném stádiu 21 (konec neurulace), jsou zatím bez filament a žaberní štěrbiny mezi nimi zůstávají neperforované. Následně se na prvním a druhém páru vytvoří základy budoucích filament. Na třetím páru jsou základy filament viditelné až v době, kdy už jsou všechny hlavní větve značně prodloužené. V době maximálního vývoje je viditelný rozdíl v délce jednotlivých

párů – druhý je delší než první a třetí může dosahovat dokonce dvojnásobné délky prvního a má daleko větší počet filament. V době, kdy nastává líhnutí už je posteriorní (předtím nejdelší) pár zatažen do dutiny žaberního váčku a resorbován. Zbylé dva páry potom larva strhne při své cestě ze souše do vody.

Rozdílně se vyvíjejí vnější žábry druhu *Gymnophis multiplicata proxima*. Nejdelším párem zde není třetí, ale druhý pár vnějších žaber. Prostřední pár se přitom začíná vyvíjet až v době, kdy už anteriorní a posteriorní páry dosahují poloviny své budoucí maximální délky, a poté pokračuje, až dokud nedosáhne dvojnásobné velikosti zbylých dvou párů (Wake, 1969). Spuštění růstu prostředního páru může korelovat se zvýšenými nároky embrya na kyslík po vyklouznutí z vitelinní membrány.

Podobný vývoj vnějších žaber je popsán ještě pro druhy *Ichthyophis glutinosus* (Sarasin & Sarasin, 1887-1890; podle Wake, 1969) a *Hypogeophis rostratus* (Brauer, 1899; podle Wake, 1969).

U živorodé čeledi Typhlonectidae mají embrya pouze jeden vakovitý pár vnějších žaber, který je omotán kolem celého těla. Tyto žábry jsou bohatě vaskularizované a v jejich epitelu najdeme mnoho specializovaných buněk, což poukazuje na možnou materno-fetální komunikaci a výměnu látek (Hraoui-Bloquet & Exbrayat, 1994). Z 12 druhů této čeledi je embryo popsáno pro 5; přítomnost takto specializovaných žaber se pro ně zdá být typická (Wilkinson & Nussbaum, 1997).

2.2 Vnější žábry dvojdyšných ryb (Dipnoi)

Bahníci patří do linie Sarcopterygii, vedoucí k dnešním tetrapodům. Evolučně je to tedy skupina nejpríbuznější společnému předku dnešních obojživelníků, a i larvy jejich současných zástupců mají, stejně jako obojživelníci, vnější žábry. Do dnešní doby se zachovaly tři oddělené sladkovodní rody bahníků, každý žijící na jiném kontinentě. Je důležité si uvědomit, že dnešní skupiny bahníků jsou vysoce specializované a těžko usuzovat, jak moc jsou odvozené od původního plesiomorfního stavu pro devonské bahníky (Burggren & Johansen, 1986), a jestli tedy podobnost vnějších žaber bahníků s vnějšími žabrami obojživelníků odráží jejich fylogenetickou příbuznost nebo se jedná o adaptaci na shodné podmínky.

2.2.1 Lepidosireniformes

Tento řád sdružuje africké a jihoamerické bahníky. V Africe se vyskytuje rod *Protopterus* a v Jižní Americe je to rod *Lepidosiren*. Jedná se pravděpodobně o velmi odvozenou skupinu, s nejpokročilejšími adaptacemi na dýchání vzdušného kyslíku. Dospělci mají dokonale vyvinuté plicní vaky a jejich vnitřní žábry jsou velmi redukované (Burggren & Johansen, 1986). Právě redukce pravých „rybích“ žaber a ještě nefungující plicní dýchání může být důvodem, proč si larvy těchto bahníků vyvinuly vnější žábry.

Detailní vývoj jihoamerického bahníka *Lepidosiren paradoxa* popsal ve své práci Kerr (Kerr, 1900). V době po zfúzování neurálních valů (asi 4 dny před vylíhnutím), jsou první výraznější strukturou na embryu čtyři výrůstky, odpovídající čtyřem budoucím větvím vnějších žaber situovaných na branchiálních obloucích I.-IV. Napojené jsou stejně jako u obojživelníků na ceratobranchialia (Witzmann, 2004). Výrůstky se dále prodlužují a se stále ještě holými výběžky dochází k líhnutí. První náznaky zpeření hlavních stonků pozorujeme 3 dny po vylíhnutí (velmi závisí na teplotě, při které vývoj probíhá). S postupným prodlužováním vznikne společný základ všech čtyř větví a toto prodlužování trvá až do 30. dne od vylíhnutí (Kerr, 1900). V době svého maximálního vývoje mají vnější žábry červenou barvu způsobenou absencí pigmentových buněk a prokrvením a larva s nimi aktivně pošukává. K metamorfóze dochází v šesti týdnech a dojde při ní mimo jiné i k zamezení krevní cirkulace ve vnějších žábrách, jejich nekrotizaci a odpadnutí.

Larvální vývoj afrického bahníka *Protopterus annectens* detailně popisuje ve své práci Budgett (Budgett, 1901b). Vývoj vnějších žaber je u obou bahníků velmi podobný, i *Protopterus* má čtyři páry. V době líhnutí má vnější žábry více vyvinuté a jednotlivé stonky jsou separované po delší dobu, než je tomu u jihoamerického bahníka. První známky vnějších žaber pozorujeme ve stádiu 18 podle Kerra (Kerr, 1909), a stejně jako u jihoamerického bahníka rodu *Lepidosiren*, nejsou vnější žábry *Protoptera* před vylíhnutím větvené. První zpeření primárních stonků vnějších žaber je pozorovatelné až ve stádiu 28 následujícím po vylíhnutí a maximálního vývoje dosahují vnější žábry kolem stádia 32. Jednotlivé páry žaber odpovídají ceratobranchialiím I.-IV., ale v době maximálního vývoje dochází k rotaci společného základu, čímž se anteriorní pár

stane ventrálním a posteriorní nejdorzálnějším (Budgett, 1901b). V době kdy larvy opouštějí hnízdo, ztrácejí první pár žaber a zbylé tři se začínají redukovat. Kolem sedmi týdnů stáří jsou z vnějšku žábry redukovány úplně, posteriorní tři páry však zůstávají zachovány, ve formě rudimentů normálně prokrvených odbočkami od aortálních oblouků, po celý život (Goodrich, 1958). To naznačuje možnou neotonii *Protoptera* (Schmalhausen, 1968).

Prokrvení vnějších žaber zajišťují aortální oblouky, které jsou však u bahníků utvářené odlišně než u tetrapod. Prokrvení zajišťují oblouky III.-VI. a III. a IV. oblouk (prokrvující první a druhý pár vnějších žaber) probíhají kontinuálně – přecházejí z afferentní branchiální arterie plynule do efferentní br. arterie. V. a VI. oblouk je však u *Protoptera* diskontinuální a najdeme zde dvě efferentní br. arterie ležící po stranách jedné afferentní (Goodrich, 1958; Laurent et al., 1978).

2.2.2 Ceratodontiformes

Australské bahníky zastupuje rod *Neoceratodus*. Na rozdíl od první skupiny bahníků však u nich vnější žábry nenajdeme a uvádím je zde jen pro úplnost a pro shrnutí rozdílů, které mohou být důvodem, proč jejich larva vnější žábry nemá.

Narozdíl od Lepidosireniformes mají australští bahníci velmi dobře vyvinuté vnitřní žábry a obecně jsou považováni za méně odvozenou skupinu (Burggren & Johansen, 1986), více podobnou jejich fosilním předkům obývajícím mořské prostředí. Mají poměrně velké osifikované operculare, které jim v možném vývoji vnějších žaber může bránit (Bemis, 1986), stejně jako mohla tato kost spolu se suboperculare (Campbell a Barwick, 1986) bránit ve vzniku vnějších žábrám u fosilních devonských bahníků *Uranolopa* a *Speonesydriona* (Witzmann, 2004). U *Neoceratoda* jsou diskontinuální branchiální aortální oblouky III.-VI. (mají dvě efferentní arterie), což je považováno za plesiomorfní stav (Goodrich, 1958).

Vnější žábry nejsou pravděpodobně u bahníků původní a vznikly až druhotně v nedávné době, v odvozené linii Lepidosireniformes (Witzmann, 2004).

2.3 Vnější žábry bichirů (Polypteriformes)

Kromě Sarcopterygíí linie najdeme vnější žábry i v linii Actinopterygíí a to u bichirů. Dlouhou dobu bylo zařazení do vyšších taxonomických celků u bichirů nejasné kvůli kombinaci jedinečných morfologických znaků. Historicky byli řazeni mezi Sarcopterygíí (Huxley, 1861; podle Patterson, 1982), nebo jako sesterská skupina Actinopterygíí a Sarcopterygíí uvnitř skupiny Teleostomi, a dnes je řadíme na bázi Actinopterygíí (Patterson, 1982; Inoue et al., 2003; Gardiner et al., 2005).

Mezi unikátní znaky bichirů patří i vnější žábry jejich larev a v linii paprskoploutvých ryb, které mají jinak perfektně vyvinuté vnitřní žábry, je to struktura naprosto ojedinělá. Jako první popsal detailně embryonální vývoj druhu *Polypterus senegalus* Kerr, podle materiálu dovezeného Budgettem (Kerr, 1903). Vývojová tabulka pak byla několikrát přepracována s větším důrazem na vývoj vnějších žaber (*P. senegalus* - Bartsch et al., 1997; *P. senegalus* a *P. ornatipinnis* - Diedhiou & Bartch, 2009; *P. senegalus* - Král'ovič, nepublikovaná data).

Základy budoucího jediného páru vnějších žaber by měly být pozorovatelné už ve stádiu 20, odpovídajícímu fázi neurulace s ještě nepřiloženými neurálními valy (Diedhiou & Bartch, 2009). Dle mých vlastních pozorování jsou však zduřeniny po stranách hlavy v hyoidní oblasti rozlišitelné až ve stádiu 23. Ve stádiu 24 nabývají eliptického tvaru a jsou orientované našikmo, s anteriorním koncem ventrálněji, než je konec posteriorní. Ve stádiu 27 se začne pupen rýhovat a najdeme na něm tři výběžky, které se dále zmnožují a představují primární větvení hlavního jediného stonku. Larva se líhne ve stádiu 28 a ve stádiu 30 můžeme pozorovat krevní cirkulaci uvnitř žaber. Ve stádiu 31 se objevují základy sekundárního větvení na všech filamentech primárního větvení a tato sekundární filamenta se postupně prodlužují a zmnožují. Vnější žábry jsou jediná dýchací struktura v embryonální i postembryonální fázi vývoje bichira, a proto jsou funkční velmi brzy. Regrese je u různých druhů časově variabilní a není výjimkou, že vnější žábry přetrvávají u larev starých 2 měsíce (Bartsch et al., 1997).

Na vnějších žábrách bichira je zajímavé mimo jiné už připojení pomocí svalů na hyoidní oblouk a prokrvení hyoidním aortálním obloukem

(Budgett, 1901), což je odlišuje od vnějších žaber v Sarcopterygní linii, kde jsou tyto asociovány vždy s branchiálními oblouky. Důvodem vývoje vnějších žaber na hyoidním obluku místo na obloucích branchiálních by teoreticky mohla být přítomnost masivního osifikovaného opercula (kost *os operculare*), které může vnějším žábrám bránit ve vývoji na branchiálních obloucích už během raných stádií (Rauther, 1947). Několik autorů uvádí, že by hlavní stonek vnějších žaber měl být vyztužen chrupavčím paprskem (Witzmann, 2004; Moy-Thomas, 1933; Budgett, 1901c), nikdo se však nepokusil tento element blíže popsat a identifikovat a jeho existence tak zůstává otázkou.

2.4 Vnější žaberní filamenta paryb (Chondrichthyes)

Vnější filamenta paryb se na první pohled velmi podobají vnějším žábrám výše zmíněných skupin, jsou však považována za rozdílnou strukturu, a proto byla nazvána vnějšími žaberními filamenty (Goodrich, 1909; Goodrich, 1958). Tento znak je u paryb považován za plesiomorfni (Wyffels, 2009) a najdeme ho jak u druhů s různým módem živorodosti (Basten et al., 2011; Hamlett, 1985), tak u vejcorodých (Pelster & Bemis, 1992; Rodda & Seymour, 2008; Didier et al., 1998; Ballard et al., 1993).

Filamenta se objevují časně v embryonálním vývoji jako dlouhé, filamentární výběžky raných vnitřních žaberních lamel. Tato filamenta vybíhají vždy z posteriorních hemibranchií (Goodrich, 1958; Basten et al., 2011), Wyffels však uvádí, že filamenta vybíhají z oblasti branchiálních oblouků ještě předtím, než se vyvíjejí vnitřní žábry a slouží k pokrytí respiračních nároků právě během nefunkčnosti vnitřních žaber (Wyffels, 2009). Do každého filamenta vybíhá kapilární smyčka, probíhající z afferentní do efferentní branchiální arterie (Goodrich, 1958) a na povrchu se nachází dvouvrstevný plochý epitel (Kryvi, 1967; podle Wyffels, 2009). U živorodých druhů mohou filamenta kromě dýchání sloužit i k absorpci živin (Goodrich, 1958; Rodda & Seymour, 2008). Možná je i osmoregulační funkce, kdy epitel žaberních filament pomáhá zadržovat močovinu, dokud si embryo nezačne plně řídit osmoregulaci (Kormanik, 1993). Filamenta jsou vždy plně resorbována před vylíhnutím, nebo narozením (podle způsobu reprodukce daného druhu).

U prostudovaných druhů (*Raja erinacea*, *Callorhinchus milii*, *Heterodontus portusjacksoni* a *Scyliorhinus canicula*) se první filamenta během embryonálního vývoje zakládají na hyoidním oblouku a dále postupně kranio-kaudálně na všech branchiálních obloucích u druhů *R. erinacea* (Pelster & Bemis, 1992), *C. milii* (Didier et al., 1998) a *H. portusjacksoni* (Rodda & Seymour, 2008), a nebo na branchiálních obloucích I.-III. a následně souběžně na mandibulárním oblouku a na IV. branchiálním u *S. canicula* (Ballard et al., 1993). U rejnoků se vnější žaberní filamenta nacházejí vždy jen na ventrální části žaberních oblouků, protože dorzální část žaberních štěrbin u nich srůstá. Jak moc jsou vnější žaberní filamenta v rámci skupiny paryb variabilní není známo, u prostudovaných druhů se však vzhled, vývoj a načasování zdají konzistentí (Wyffels, 2009).

2.5 Vnější žaberní filamenta paprskoploutvých ryb (Actinopterygii)

Paprskoploutvé ryby dýchají stejně jako paryby pomocí pravých žaber, leč i u nich můžeme nalézt vnější žaberní filamenta jako specializovanou strukturu larválního dýchání, ačkoliv výskyt těchto filament není tak hojný, jako je tomu u paryb. Obecně je najdeme u všech druhů ryb, které mají v larválním stádiu problémy s dostupností kyslíku - Acipenseridae, Cobitidae, Osteoglossiformes, Clariidae (dle RNDr. B. Drozda).

Krátká vnější žaberní filamenta byla nalezena u jesetera druhu *Acipenser baeri* (Gisbert, 1999). Základy žaberních filament pozorovatelné pod operkulem zhruba 1-2 dny po vylíhnutí se dále během prelarvální fáze zvětšují a dosahují své maximální funkce a velikosti. Na začátku larvální fáze jsou už filamenta opět plně překryta operkulem.

Daleko významnější strukturou jsou vnější žaberní filamenta u sekavcovitých ryb (Cobitidae) a existuje několik vývojových tabulek popisujících raný vývoj druhů z této čeledi – *Misgurnus fossilis* (Kryžanovskij, 1949; Kostomarov, 1991; Grieb, 1937), *Misgurnus anguillicaudatus* (Fujimoto et al., 2006), *Cobitis taenia* (Kryžanovskij, 1949) a *Cobitis takatsuensis* (Shimizu et al., 1998).

Nejlépe posaný je vývoj pro druh *M. fossilis* a pro čeleď Cobitidae je typický. Při teplotě 21,5 °C se základy prvních dvou párů objevují těsně po vylíhnutí ve stádiu 38 (stáří 1 den) (Kostomarova, 1991), pokud k vývoji dochází za nižších teplot (16-20 °C), dochází ke kulení až ve stáří 4 dny a 6 hodin a základy nitřovitých žaber se objevují při stáří 4 dny a 23 hodin (Kryžanovskij, 1949). Následně se zakládá třetí pár a je patrný intenzivní průtok krve dokazující respirační funkci (Kryžanovskij, 1949). Maximální délky dosahují vnější žaberní filamenta ve stádiu 40 (Kostomarova, 1991) nebo ve stáří 10 dní (při teplotě vody 18-22 °C) (Kryžanovskij, 1949). Poté dochází k přebírání dýchací funkce segmentálními cévami v nepárovém ploutevním lemu a ke zkracování vnějších žaberních filament (Kostomarova, 1991; Kryžanovskij, 1949).

Z ryb řádu Osteoglossiformes jsou vnější žaberní filamenta popsána pro druhy *Heterotis niloticus* (Budgett, 1901b; Hermens et al, 2007) a *Gymnarchus niloticus* (Assheton, 1907). U druhu *H. niloticus* se filamenta objevují 6 hodin po vylíhnutí na prvních třech branchiálních obloucích a posléze i na IV. branchiálním oblouku. Po uplynutí 72 hodin od vylíhnutí začínají filamenta resorbovat, nebo mohou být odlomena. Nakonec je celá žaberní oblast překryta operkulárním záhybem. Autoři uvádějí, že původ vnějších žaberních filament druhu *H. niloticus* je entodermální a narozdíl od vnějších žaberních filament paryb mají pouze respirační funkci (Hermens et al., 2007). Entodermální původ filament, která jsou vlastně prodlouženými výbežky pravých vnitřních žaber, je ale v rozporu s teorií ektodermálního původu vnitřních žaber u čelistnatců (žábry entodermálního původu by měli mít pouze bezčelistnatí) (Gaisler & Zima, 2007). U druhu *G. niloticus* se vnější žaberní filamenta objevují pátý den vývoje a vyrůstají z anteriorní i posteriorní vnější hrany žaberních oblouků I.-IV. Filamenta, která jsou vždy nevětvená, jsou tvořena afferentní a efferentní kapilární smyčkou a pokrývá je vrstva ektodermu. Assheton (Assheton, 1907) uvádí, že i posléze přetrvávající vnitřní žábry jsou ektodermálního původu. Narozdíl od předchozího druhu, přetrvávají u *G. niloticus* vnější filamenta delší dobu (lze je pozorovat ještě u jedinců stáří 16 dní).

3 Materiál a metody

3.1 Embrya

Embryonální materiál druhu *Polypterus senegalus* byl získán z chovů p. Tichého v Kravařích u Opavy. Albinotická embrya a larvy druhu *Ambystoma mexicanum* pocházela z chovů Vladimíra Soukupa z Katedry zoologie na PřF UK. Příslušná stádia embryí a larev druhu *Misgurnus fossilis* ochotně dochoval a poskytl RNDr. B. Drozd z Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, za což bych mu na tomto místě chtěla poděkovat. Živá embrya byla podle potřeby dochována v laboratorních podmínkách do příslušného stádia a po anestezizaci roztokem MS-222 (Serva) fixována v 4% roztoku PFA (paraformaldehyd) a dále skladována ve 4 °C.

Pro určení stádií bichira (*P. senegalus*) byla použita stádiovací tabulka z roku 2009 (Diedhiou & Bartch, 2009). Stáří embryí a larev axolotla (*A. mexicanum*) bylo určeno podle tabulky z roku 1989 (Bordzilovskaya et al., 1989), pro piskoře (*M. fossilis*) byla použita tabulka podle Kostomarové (Kostomarova, 1991).

3.2 Skenovací elektronová mikroskopie

Embrya a larvy pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) byla po počáteční fixaci v PFA dále postfixována po dobu nejméně 24 hodin v Karnovského fixativu (2% roztok glutaraldehydu v PFA). Dále postupně vzestupnou ethanolovou řadou odvodněna a převedena do čistého ethanolu. U druhu *A. mexicanum* následovalo dále ještě převedení do 100% acetonu. Takto upravené vzorky byly poté v Laboratoři elektronové mikroskopie PřF UK vysušeny metodou CPD (Critical Point Drying – sušení pomocí kritického bodu CO₂) pomocí aparatury Bal-Tec CPD 030. Po přenesení na molybdenové terčíky opatřené oboustranou lepící plochou, byly vzorky pozlaceny v aparatuře Bal-Tec SCD 050 a pozorovány pod skenovacím elektronovým mikroskopem JEOL 6380 LV.

3.3 Histologické řezy

Vzorky pro klasickou histologii byly z fixáže plynule převedeny vzestupnou alkoholovou řadou do čistého ethanolu. Dále podle návodu zality do umělé pryskyřice JB-4 (Polyscience), která bez přístupu vzduchu polymeruje do pevné formy. V případě nevhodné orientace embrya či larvy byl vzorek vhodně seříznut a přezalit opět JB-4 do nového bločku. Bločky byly poté nařezány na mikrotomu Leica CM 3050S na řezy tloušťky 5-9 μ m. Po vysušení byly řezy na podložním sklíčku nabarveny Azure-B/Eosinem (Serva), překryty krycími slíčky nalepenými pomocí pryskyřice DPX (Fluka) a po zatvrdnutí pozorovány pod světelným mikroskopem Olympus BX 51. Autorem některých řezů druhu *A. mexicanum* je R. Černý.

3.4 Kryostatové řezy a imunohistochemické barvení

Vzorky určené pro řezání na kryostatu byly nejdříve promyty po dobu 3x10 minut v PBS, aby se vyplavila všechna fixáž (PFA). Poté byly vzorky postupně prosycovány 7,5% a 15% roztokem cukrůzy v PBS a to vždy po dobu 2 hodin při teplotě 4 °C, a dále roztoky se stoupající koncentrací želatiny (7,5%, 15% a 20%) v 15% cukrůze vždy po dobu 8 hodin při 37 °C. Takto připravené vzorky byly zality do komůrek na silikonovou destičku (Polyscience) a naorientovány pro potřeby dalšího řezání. Po zmrazení v komoře kryostatu Leica CM 3050S na -25 °C byly bločky připevněny na upevňovací terčiky pomocí Tissue Freezing Media (Jung) a krájeny na řezy tloušťky 6-7 μ m. Sklíčka s řezy byla před dalším zpracováním skladována ve 4 °C při vysoké vzdušné vlhkosti zabraňující vysychání.

Před vlastním imunohistochemickým barvením bylo nutno řezy nejdříve odžlatinizovat krátkým ponořením do odžlatinizovacího roztoku (3% želatina v 38% ethanolu) rozpuštěného na 37 °C a následným opláchnutím v destilované vodě. Po oschnutí při pokojové teplotě byla sklíčka ošetřena 1% roztokem BSA (Bovine Serum Albumin) a nanesena primární protilátka fibronektin (rabbit anti-human, Dako) a na některé řezy i 12/101 (protilátka proti myosinu, mouse anti-newt, Developmental studies Hybridoma Bank) v poměru ředění 1:100 (fibronektin) a 1:200 (12/101). Sklíčka s primární protilátkou byla uložena přes noc v plastovém boxu s vysokou vzdušnou vlhkostí do 4 °C. Po

uplynutí dané doby byla odlita primární protilátka a po okamžitém opláchnutí PBS byly přebytky vypláchnuty PBS 3x po 10 minutách. Jako sekundární protilátka byla použita goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen, ředění 1:500), v případě fibronektinu, a goat anti-mouse Alexa Fluor 594, v případě 12/101 (Invitrogen, ředění 1:200). Tyto sekundární protilátky umožňují vizualizaci navázané primární protilátky pomocí barevně odlišené fluorescence. Sklíčka se sekundární protilátkou byla přes noc opět uložena v plastovém boxu s vysokou vzdušnou vlhkostí ve 4 °C. Přebytečná protilátka byla následující den propláchnuta pomocí PBS 3x 10 minut a sklíčka s nabarvenými řezy byla zalita Vectashieldem s DAPI (Vector, umožňuje vizualizaci buněčných jader pomocí fluorescenčního značení DNA značkou DAPI) a přikryta krycími sklíčky. Skladováno ve 4 °C. Řezy byly poté pozorovány pod mikroskopem Olympus BX 51.

3.5 Projasněné preparáty celých jedinců

Preparáty starších larev druhu *P. senegalus*, nabarvené kombinací histologických barev Alcian Blue 8 GX (Sigma) a Alizarin Red S (Sigma) a následně projasněné, zhotovil M. Kral'ovič. Alciánová modrá se váže na glykoproteiny obsažené v extracelulární matrix chrupavek a způsobuje jejich modrá zbarvení. Alizarinová červená naproti tomu barví vápenaté ionty obsažené v extracelulární matrix a značí tak mineralizované tkáně, jako jsou zuby a kosti. Toto dvojité barvení umožňuje lépe chápat vzájemné postavení a detekci všech elementů podpůrné soustavy. Po odstranění přebytečných tkání a prosvětlení byly vzorky převedeny do 100% glycerolu a skladovány ve 4 °C. Podrobný postup barvení a následného projasňování lze nalézt v práci M. Kral'oviče (Kral'ovič, 2009). Pozorováno pomocí stereolupy Olympus SZX12 s digitální kamerou Olympus DP70.

3.6 Značení populace buněk neurální lišty

Pro pozorování buněk neurální lišty u *A. mexicanus* byla použita embrya se značenou populací buněk neurální lišty. Principem značení je transplantace neurálních valů z transgenních GFP mutantů (exprimujících v každé buňce těla zelený fluorescenční protein) na albinotické jedince. Takto upravení jedinci se

nechají vyvinout do požadovaného stádia a poté lze pozorovat příspěvek neurální lišty do výsledných tkání na kryostatových řezech pod fluorescenčním mikroskopem. Vlastní transplantace a následné zpracování vzorků provedla L. Kloučková. Podrobné postupy lze nalézt v její diplomové práci (Kloučková, 2011).

3.7 Zpracování dat

Obrázky z fluorescenčního mikroskopu byly skládány do vícebarevné podoby v programu Spot Advanced (Diagnostic Instruments). Finální úpravy jednotlivých obrázků a skládání výsledných tabulí bylo prováděno v programu Adobe Photoshop CS4. Schéma z Obrázku č. 7 bylo vytvořeno pomocí programu Corel Draw.

4 Seznam použitých zkratk

1 - žaberní štěrbina mezi hyoidním a I. branchiálním obloukem

2 - žaberní štěrbina mezi I. a II. branchiálním obloukem

3 - žaberní štěrbina mezi II. a III. branchiálním obloukem

4 - žaberní štěrbina mezi III. a IV. branchiálním obloukem

5 - žaberní štěrbina mezi IV. a V. branchiálním obloukem

B1 - I. branchiální oblouk

B2 - II. branchiální oblouk

B3 - III. branchiální oblouk

B4 - IV. branchiální oblouk

ba - branchiální arterie

cb - ceratobranchiale (pozičně neurčené)

cb1 - ceratobranchiale I.

cb2 - ceratobranchiale II.

cb3 - ceratobranchiale III.

ekt - ektodermální povrchový epitel

ent - entodermální epitel faryngu

f - farynx

F1 - vnější žaberní filamentum na I. branchiálním oblouku

F2 - vnější žaberní filamentum na II. branchiálním oblouku

F3 - vnější žaberní filamentum na III. branchiálním oblouku

F4 - vnější žaberní filamentum na IV. branchiálním oblouku

G1 - první vnější žábra

G2 - druhá vnější žábra

G3 - třetí vnější žábra

H - hyoidní oblouk

ha - hyoidní arterie

hm - hyomandibula
ch - ceratohyale
ks - kapilární smyčka
m - mozek
mes - mesenchym
mez - mezoderm
n - notochord
nc - populace buněk neurální lišty
o - operkulární kožní záhyb
ot - otická kapsule
ov - operkulární výběžek
pf - primární filamentum
pq - palatoquadratum
ps - primární stonek vnějších žaber
sf - sekundární filamentum
spf - sval jdoucí do primárního filamenta
sr - srdce
ss - somitické svalstvo
sv - sval jdoucí do vnějších žaber

5 Výsledky

5.1 *Polypterus senegalus*

Bichir nese velké množství unikátních, vysoce specializovaných, ale i mnoho velmi starobylých znaků, a tato kombinace byla odjakživa důvodem jeho nejasného postavení na fylogenetickém stromě. Poté, co mu konečně byla přisouzena pozice na bázi paprskoploutvých ryb, začala být přítomnost takového znaku, jako jsou vnější žábry podobné vnějším žábram obojživelníků, přinejmenším překvapivá. Proto jsem se ve své diplomové práci zaměřila právě na vnější žábry bichira a jejich srovnání s vnějšími žábami ostatních fylogeneticky vzdálených skupin.

5.1.1 Vnější morfologie (SEM)

Obrázky ze skenovacího elektronového mikroskopu byly pořízeny s cílem co nejdetailněji popsat vnější morfogenezi a vzhled vnějších žaber bichira tak, aby výsledky umožnily vnější žábry komparovat s ostatními druhy. Toto srovnání, ať už výsledných struktur nebo jednotlivých fází vývoje, je bezpodmínečně nutné, pokud se chceme zabývat otázkami vzájemné homologie vnějších žaber.

Vnější žábry se u bichira zakládají po stranách hlavy v oblasti za budoucí spirakulární štěrbinou (štěrbina prolamující se mezi mandibulárním a hyoidním obloukem) velmi brzy v rané ontogenezi. Ve stádiu 23, následujícím ihned po stádiu splynutí neurálních valů (st. 22), je pozorovatelné nepatrné vyboulení v místě budoucích vnějších žaber. V tomto stádiu to je jeden z mála viditelných bodů na embryu, jedinou další pozorovatelnou strukturou jsou cementové orgány prominující v anteriorní části hlavy. Ve stádiu 24 mají formující se vnější žábry polokulovitý tvar a spolu s párem cementových orgánů zabírají prakticky celý hlavový prostor embrya. Lehce větší primordia vnějších žaber označují posteriorní konec hlavy a vybíhají laterálně (Tab. 1 A, A'), ventrálněji potom vybíhají cementové orgány okupující anteriorní část hlavy. V pokožce celého embrya jsou v tomto stádiu takřka rovnoměrně rozmístěny buňky s ciliemi na povrchu. V dalším vývoji se základy vnějších žaber začnou dorzo-ventrálně zplošťovat, osa vnějších žaber však není s dorzo-ventrální osou embrya úplně

rovnoběžná a anteriorní konec základu vnějších žaber se tak dostává o něco ventrálněji, než ten posteriorní. Okolo stádia 26 můžeme pozorovat 2-3 zářezy vymezující budoucí filamenta oddělující se od hlavního stonku vnějších žaber (Tab. 1 B''). V tomto období začíná být patrný rozdíl velikosti epidermálních buněk pokrývajících vnější žábry (průměr do 10 μ m) od epidermálních buněk zbytku povrchu embrya (průměr většinou nad 10 μ m). Buňky pokrývající vnější žábry jsou menší v důsledku růstu celé struktury množováním buněk, a ne zvětšováním jejich povrchové plochy. Ve stádiu 28 vybíhá z hlavního stonku vnějších žaber pět filament (Tab. 1 C', C'') a v této fázi růstu dochází k zvětšování vnějších žaber především pomocí prodlužování a množování primárních filament. Samotný hlavní stonek zůstává prakticky stejně dlouhý jako v předchozích stádiích. V následujícím stádiu mají vnější žábry kolem osmi primárních filament různé délky (Tab. 1 D', D''). Ta nejdelší dosahují zhruba dvojnásobné délky nejdelších filament předchozího stádia. Můžeme již pozorovat další větvení vnějších žaber ve formě sekundárních filament odvětvujících se z nejdelších primárních filament (Tab. 1 D''). Ve stádiu 31 jsou primární filamenta zhruba 300-400 μ m dlouhá a na všech nalezneme sekundární filamenta. Došlo k prodloužení i hlavního stonku a celé vnější žábry teď dosahují délky zhruba 3/5-3/4 žloutkového váčku (Tab. 1 E'). Ve stádiu 33, kdy již larva vstřebala velké množství z původních žloutkových zásob, jsou vnější žábry plně vyvinuté a plně funkční. S dalším růstem larvy se dále prodlužují, uspořádání a stavba už ale zůstávají stejné. Ve finální podobě nalezneme na hlavním stonku dvě řady primárních filament, z nichž každé je zpeřeno dvěma řadami sekundárních filament, které mezi sebou svírají úhel mezi 60-70° (Tab. 1 F''). Povrch embrya je i nadále poset obrvenými buňkami, které jsou co do počtu hojnější v povrchové epidermis vnějších žaber, než mimo ně.

5.1.2 Histologie (JB-4)

Pro lepší porozumění okolnostem vzniku externích struktur, pozorovaných na snímcích pořízených technikou SEM, byla klíčová stádia nařezána na tenké řezy tak, aby bylo možné pozorovat, jaké morfogenetické pochody se odehrávají v oblasti vzniku vnějších žaber.

V nejranějším použitém stádiu (24) lze na frontálním řezu pozorovat počínající laterální vybouleninu časných vnějších žaber. Na povrchu této vybouleniny nalezneme dvouvrstevný epitel tvořící vnější pokryv, jedná se o stejný ektoderm, který pokrývá i zbytek embrya. Na řezech lze odlišit ještě faryngeální epitel, vzniklý z vnitřního zárodečného listu – entodermu. Entoderm je poměrně snadno odlišitelný podle velkého množství žlutkových granul přítomných v buňkách. Můžeme vidět, že faryngeální entoderm má tendenci expandovat laterálně, směrem do oblasti vznikajících vnějších žaber (Tab. 2 A). Buňky bichira jsou však poměrně malé a jasnou hranici mezi jednotlivými epitely, která by ukázala jak daleko faryngeální entoderm zasahuje, není prakticky možné v tomto stádiu určit. Dorzálně od vznikajících vnějších žaber se nachází otická kapsule, což koresponduje s předpokládanou pozicí vnějších žaber na hyoidním oblouku, patřícímu mezi žaberní oblouky, tvořící část lebky zvanou viscerokranium.

Ve stádiu 26 jsou už jednotlivé vnitřní struktury diferencovanější a hranice mezi epitely lze lépe pozorovat. Na frontálním řezu vedeném anteriorní částí vnějších žaber je jasně odlišitelný výběžek faryngeálního epitelu vybíhající ze spodního okraje faryngu do vnějších žaber (Tab. 2 B, B'). Faryngeální entoderm proniká do vnějších žaber těsně podél jejich ventrální stěny tvořené ektodermem; tyto dvě vrstvy jsou zde ve velmi úzkém kontaktu, bez přítomnosti mezenchymatických buněk vyplňujících jinak velkou část lumen vnějších žaber.

Ve stádiu 28 je na horizontálním řezu vidět první žaberní štěrbina mezi hyoidním a prvním branchiálním obloukem, která se nachází posteriorně za vnějšími žábry (Tab. 2 C, C'). Anteriorně od nich lze pozorovat vznikající spirakulární štěrbinu, která se zatím neotvírá do vnějšího prostředí. V souladu s poznatky z SEM lze pozorovat, že buňky pokrývající vnější žábry mají menší plochu apikální membrány a oproti plochým pokryvným buňkám jinde na těle mají tyto buňky, v obou vrstvách pokrývajících vnější žábry, kubičtější tvar (Tab. 2 D).

Pro pozorování plně vyvinutých vnějších žaber jsem nařezala stádium 33. V tomto období lze pozorovat již vyvinuté chrupavky vyztužující prsní ploutve, branchiální oblouky, pouzdro otické kapsule, stejně jako parachordalia tvořící bázi neurokrania. Uvnitř vnějších žaber žádná chrupavčitá výztuha v tomto stádiu vývoje není, mezenchymatické buňky však produkují velké

množství extracelulární matrix, jejíž mukopolysacharidové složky reagují s použitým histologickým barvivem a výsledkem je pozorovatelné fialové zbarvení (Tab. 3 A). Cévní zásobení zajišťuje hyoidní arterie (Tab. 3 B, B'), která se dále větví a kapilární smyčku můžeme najít ve všech sekundárních filamentech (Tab. 3 F, G). Do vnějších žaber proniká sval upínající se z boku na lebku v místě otické kapsule, posteriorně za připojením hyoidního oblouku na lebku, a je pravděpodobné, že se sval upíná i na tento dorzální element hyoidního oblouku (Tab. 3 B'). Svalové vyztužení probíhá daleko do primárního stonku a některá vlákna jdou dokonce i do odvětvujících se primárních filament (Tab. 3 C).

Na snímcích pořízených SEM technikou jsou vidět dvě řady sekundárních filament, histologické řezy však odhalily, že některá primární filamenta nesou navíc ještě sekundární filamenta vmezeřená mezi původní dvě řady (Tab. 3 E). Četnost těchto vmezeřených filament bude pravděpodobně záviset na vnějších podmínkách, ve kterých se daná larva nachází a bude napříč jedinci individuální. Za zmínku také stojí kožní lemy, které můžeme najít na ceratobranchiálních I.-III. ve stádiu 33. Táhnou se po celé délce žaberních štěrbin a jsou vyplněny mezenchymem histologicky naprosto shodným s tím, kterým jsou vyplněny hyoidní vnější žábry. Dokonce můžeme pozorovat prokrvení těchto lemů, jelikož jsou ale z vnějšku dokonale překryty rozvětvenými vnějšími žábry, pravděpodobně nemají pro respiraci význam.

5.1.3 Imunohistochemické značení

Na histologických řezech raným embryem jsem objevila zajímavou skutečnost, že během časného vývoje proniká do oblastí vznikajících vnějších žaber faryngeální entoderm. Proto jsem se rozhodla analyzovat tuto skutečnost ještě jinou metodou. Značení fibronektinu pomocí imunohistochemické značky s navázanou fluorescenční protilátkou umožňuje vizualizaci bazálních lamin, a tím jasnější určení hranic mezi jednotlivými epitely.

Protože bichir není běžným modelovým druhem, očekávala jsem, že protilátka proti fibronektinu by se mohla hůře navazovat. To se nakonec nepotvrdilo a ukázalo se, že protilátka značí bazální laminy opravdu dobře (Tab. 4 A), bohužel pouze tam, kde opravdu jsou. Mým cílem bylo naznačit jasně hranici mezi faryngeálním entodermem, pronikajícím do vnějších žaber a

ektodermem, pokrývajícím jejich povrch. Hranice tkání však v této fázi vývoje ještě není finálně ustanovená, a ať už faryngeální entoderm aktivně postupuje směrem do vnějších žaber, a nebo je tam pasivně vytlačován, je tato oblast stále místem probíhající morfogeneze. V důsledku této aktivity došlo k rozpuštění bazálních lamin, které by jinak oddělovaly epitely od sebe, a proto je nelze vizualizovat (Tab. 4 B). Rozpuštění bazální laminy lze demonstrovat na řezech posteriornější oblastí embrya, kde také dochází ke kontaktu faryngeálního entodermu s povrchovým ektodermem (Tab. 4 C, D).

Při pozorování řezů pod fluorescenčním mikroskopem však vyšlo najevo, že žloutková granula, nacházející se ve velkém množství v buňkách entodermu, mají v červeném spektru značnou autofluorescenci. Autofluorescence tedy umožňuje velmi přesné odlišení buněk faryngeálního entodermu a jejich vizualizaci ve vznikajících vnějších žábách (Tab. 4 E). Na frontálních řezech je vidět, že entoderm proniká až do nejdistanějšího konce vnějších žaber a utváří vrstvu ležící těsně pod vrstvou ektodermálního epitelu, se kterým posléze pravděpodobně splývá. Příмым důsledkem laterální expanze entodermu by dokonce mohl být i samotný růst vnějších žaber (ve formě zvětšení laterální vybouleniny) během raných fází ontogeneze.

Abych vyvrátila spekulace, že by stopy entodermu ve vnějších žábách mohly být pouze druhotným následkem prolamování spirakula v přilehlé oblasti mezi obloukem hyoidním (nesoucím vnější žábry) a mandibulárním, pozorovala jsem pod fluorescenčním mikroskopem i horizontálně nařezané embryo (Tab. 4 F). Na těchto řezech je jasně patrné, že se v případě spirakula i vnějších žaber jedná o samostatné výběžky faryngeálního epitelu a nejedná se tedy pouze o jedinou laterální expanzi.

Kromě protilátky proti fibronektinu jsem některá starší embrya (st. 29) značila ještě markerem 12/101 vážícím se na mezodermální svalstvo. Marker výborně ukázal již pěkně vyvinuté somitické svaly (Tab. 4 G), svaly vedoucí do vnějších žaber se mi však zachytit nepodařilo. Jelikož se jedná o mladší stádium, než to použité pro klasickou histologii (Tab. 3 B'), svaly vnějších žaber ještě pravděpodobně nebyly tak vyvinuté a signál byl o dost slabší, než u somitického svalstva, proto nejsou v tomto stádiu svaly pozorovatelné. Na řezech jsou však velmi dobře vidět diferencované vnější žábry s dvouvrstevnou pokožkou na povrchu, oddělenou bazální laminou od lumen, tvořeného

buňkami typicky mezenchymatické stavby a velkým množstvím extracelulární matrix.

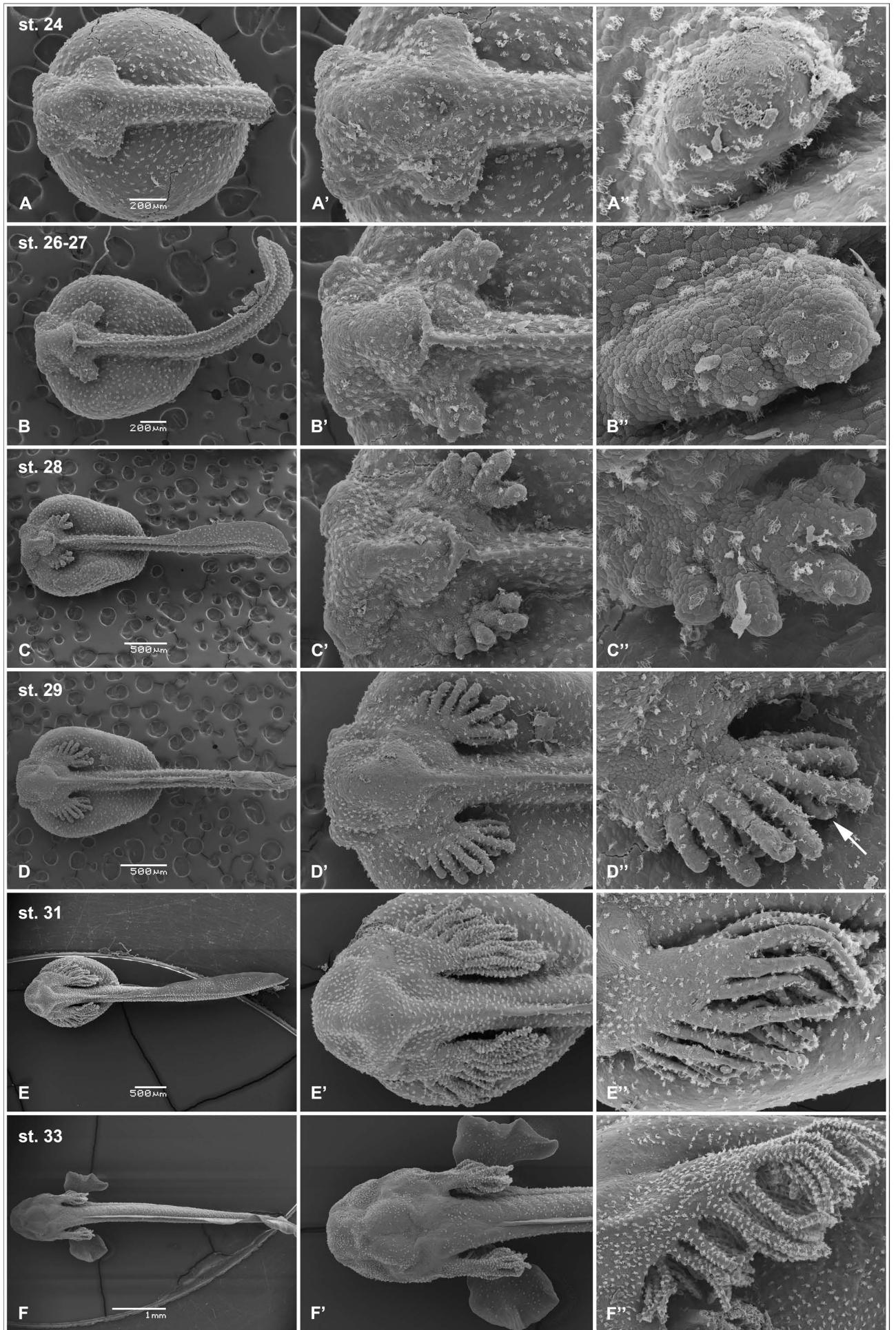
5.1.4 Projasněné preparáty celých jedinců

V literatuře se objevuje mnoho zmínek o tom, že vnější žábry bichira jsou od ostatních odlišné mimo jiné tím, že obsahují chrupavčitou výztuhu (Witzmann, 2004; Moy-Thomas, 1933; Budgett, 1901c). Na histologických řezech jsem žádnou chrupavčitou tyčinku, ani ve stádiu časně kondenzace buněčných jader, nenašla. I když u nejstaršího analyzovaného stádia (st. 33) už můžeme pozorovat jiné vyvinuté chrupavky (ceratobranchialia, parachordalia, pletenec prsní ploutve), neznámá nepřítomnost chrupavky vyztužující vnější žábry nutně to, že neexistuje vůbec. Mnohé chrupavčité části totiž mohou kondenzovat až v pozdějším vývoji. Proto bylo nutné, abych se podívala, jak vypadá situace u starších larev bichira.

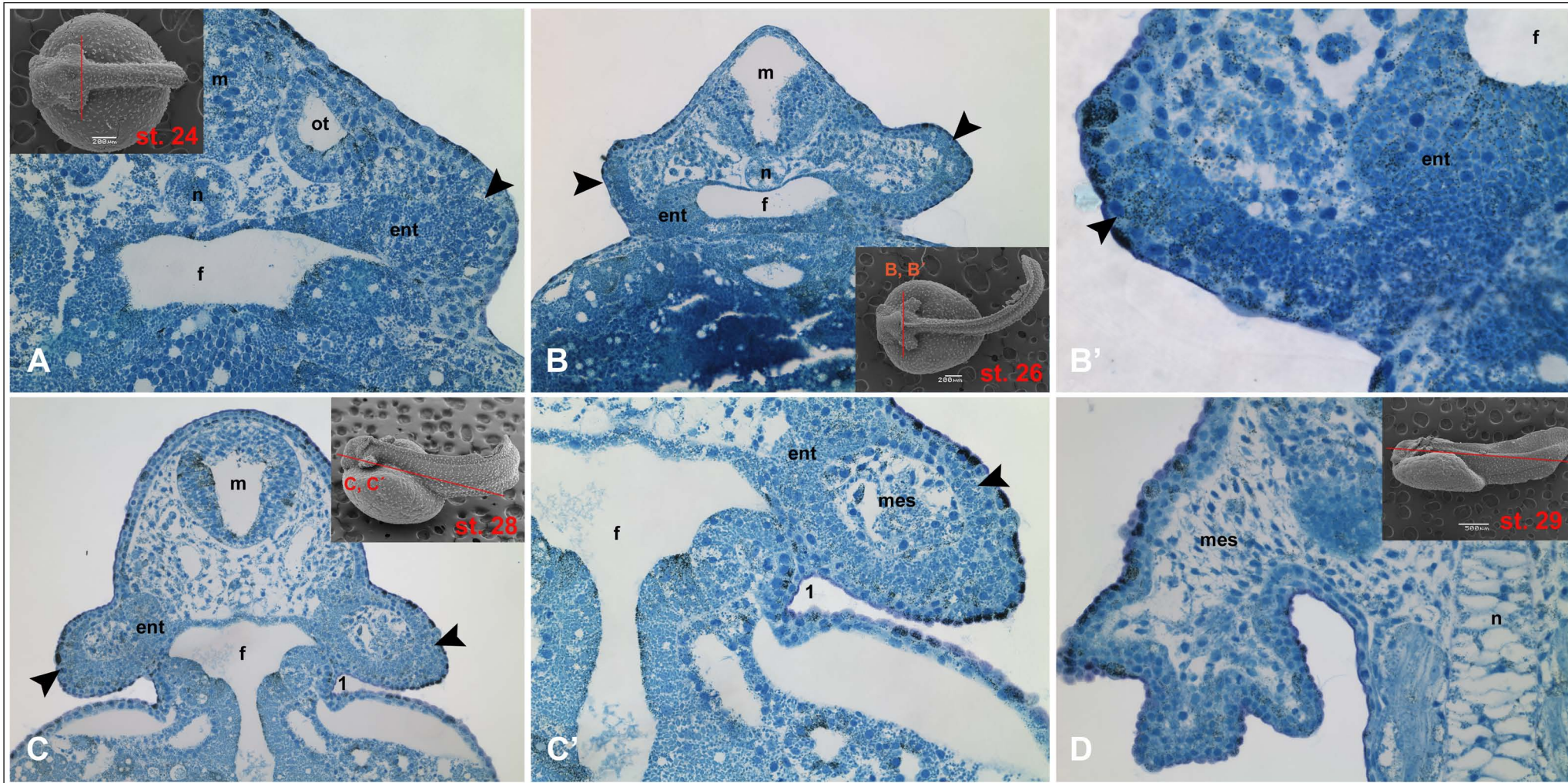
Pro tyto účely výborně posloužily preparáty mého kolegy M. Král'oviče, který se ve své diplomové práci zabýval vývojem zubních polí u bichira, a jemuž bych chtěla poděkovat, že jsem jeho preparáty mohla pro svou analýzu použít. Při této metodě barvení jsou chrupavky nabarvené na modro, pomocí histologické barvy Alcian Blue, barvící glykoproteiny extracelulární matrix a mineralizované tkáně (kosti, zuby) na červeno, pomocí histologické barvy Alizarin Red, vážící se na vápenaté ionty. Výsledkem je preparát s vizualizovanými chrupavkami a kostmi, se zachovaným 3D uspořádáním.

Podle literatury jsem pro pozorování pod stereolupou vybrala jedince velikosti 32 a 39 mm. Velká část kostí lebky je v této době již osifikovaná a chrupavčité zůstávají většinou kloubní plošky. V oblasti odstupu vnějších žaber od hyoidního oblouku právě jednu takovou kloubní plošku můžeme nalézt na zakončení operkulárního výběžku hyomandibuly (Tab. 5 B'). Tento výběžek spojuje hyomandibulu s vnitřní plochou operkula (Allis, 1922). Žádnou další chrupavku ve formě prodloužené tyčinky jdoucí do vnějších žaber, jsem zde nenašla.

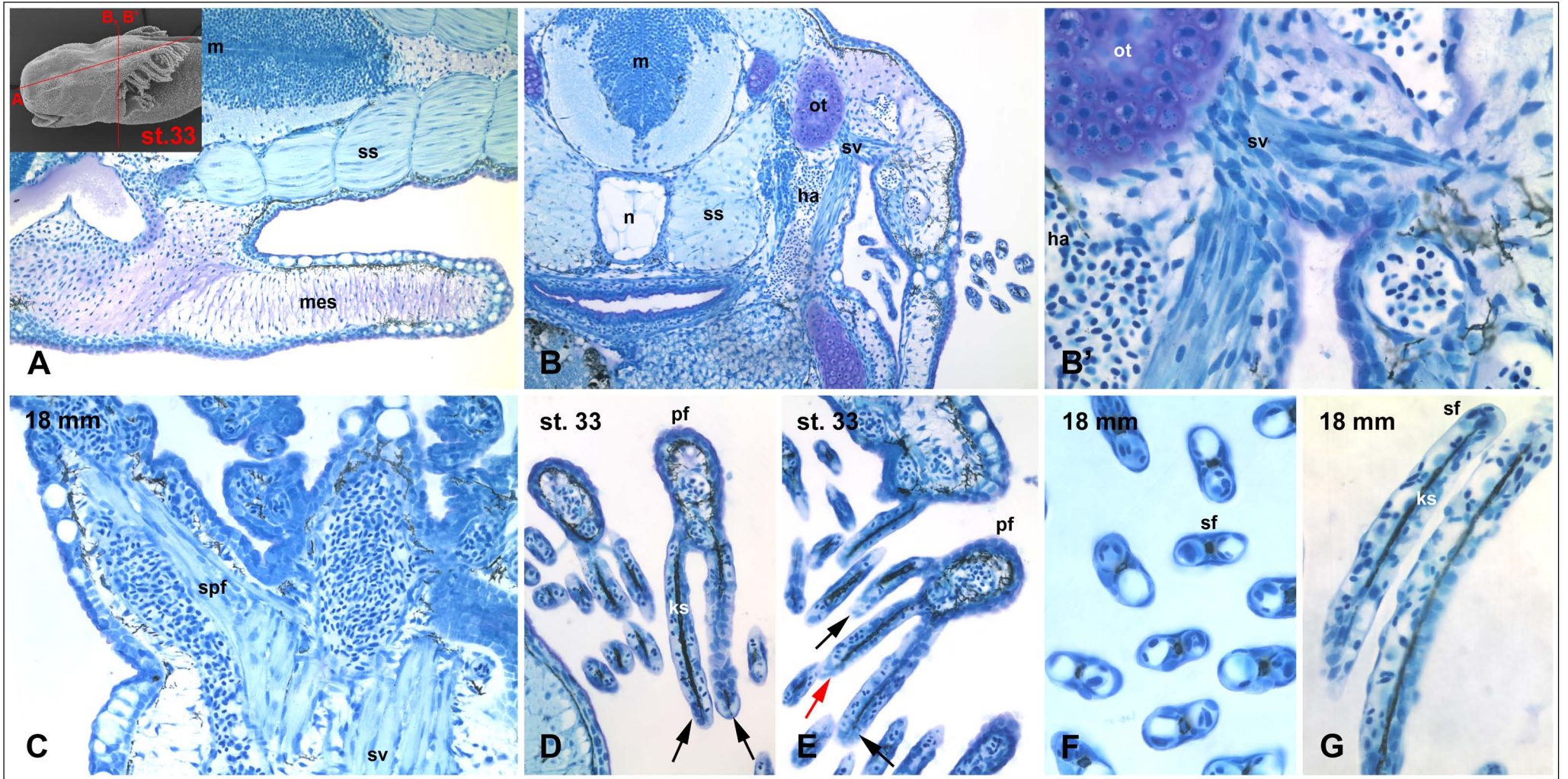
Tabule 1: Tabulka externího vývoje vnějších žaber druhu *Polypterus senegalus*. (A-F) Celkový dorzální pohled na jednotlivá stádia s vnějšími žábami umístěnými laterálně. (A'-F') Bližší pohled z dorzální strany na hlavu embrya (resp. larvy) s vnějšími žábami. (A'' -F'') Detail vnějších žaber. Povšimněte si vzrůstajícího počtu odvětvujících se primárních filament a počínajícího sekundárního větvení označeného šipkou (D'').



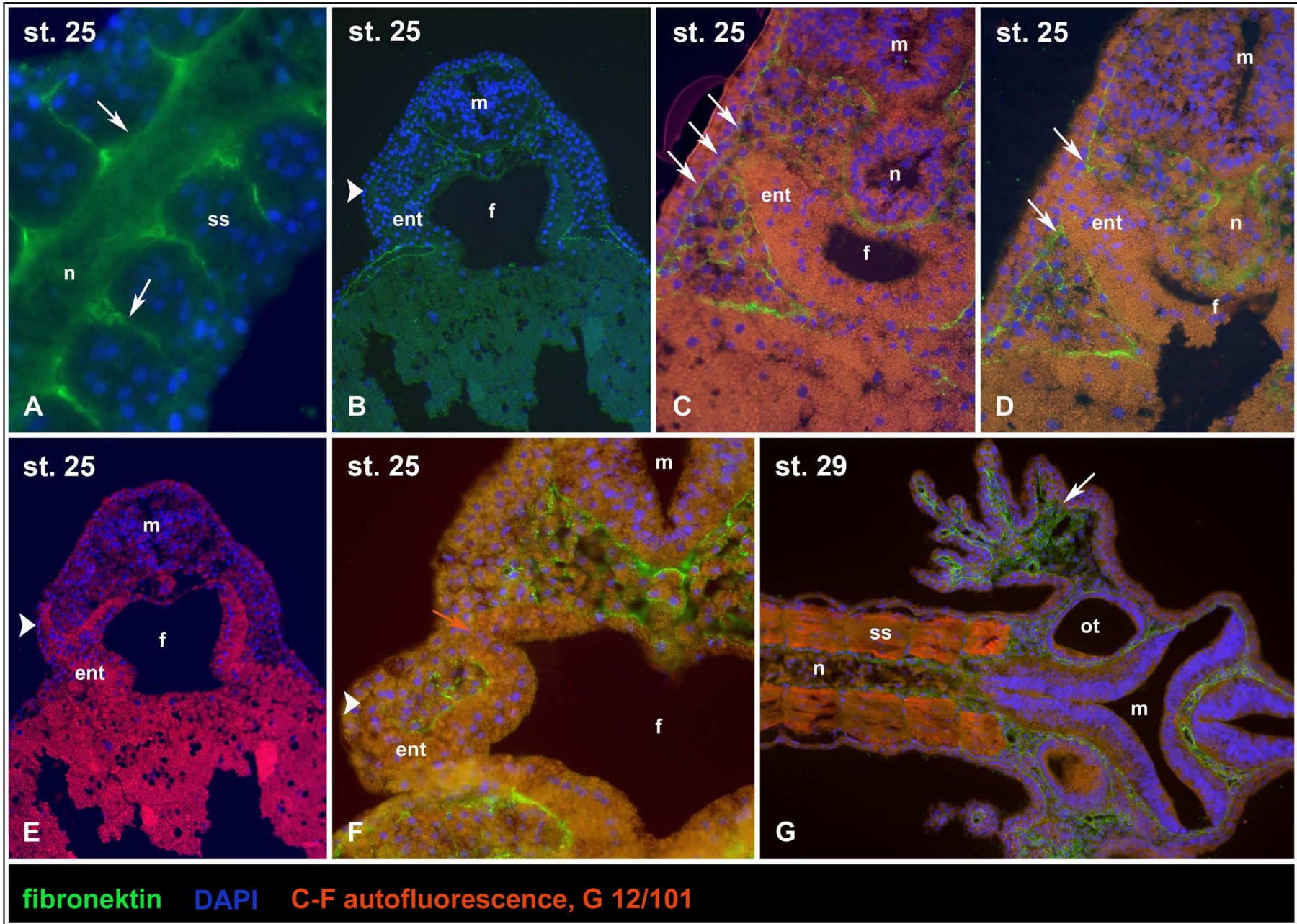
Tabule 2: Morfogeneze raného vývoje vnějších žaber druhu *Polypterus senegalus* na histologických řezech. (A) Frontální řez stádiem 24 v oblasti počínající vybouleniny vnějších žaber. (B) Frontální řez stádiem 26 v oblasti vnějších žaber. (B') Detail předchozího řezu ukazující laterálně expandující entoderm. (C) Horizontální řez stádiem 28 v úrovni vnějších žaber. (C') Detail předchozího řezu s žaberní štěrbinou mezi hyoidním a I. branchiálním obloukem. (D) Horizontální řez stádiem 29 v rovině dorzální části vnějších žaber. Pokožkové buňky jsou v epitelu pokrývajícím vnější žábry nápadně kubičtější, než typické dlaždicovité buňky zbytku tělního pokryvu. (A-C') Hrot označuje laterální expanze entodermu. (A, B, C, D) V rámečku SEM snímek příslušného stádia s vyznačenou rovinou řezu.



Tabule 3: Tkáňová diferenciacie v pokročilé fázi vývoje vnějších žaber druhu *Polypterus senegalus* na histologických řezech. (A) Horizontální řez stádiem 33 v oblasti hlavního stonku vnějších žaber. Výplň tvoří mesenchymatické buňky produkující extracelulární matrix. (B) Frontální řez stádiem 33 v oblasti vnějších žaber. Krevní zásobení zajišťuje hyoidní arterie. (B') Detail předchozího řezu ukazující úpon svalu, zajišťujícího pohyb vnějších žaber, na otickou kapsuli. (C) Řez vnějšími žábry jedince o velikosti 18 mm. Vlákna svalu vnějších žaber zacházejí i do primárních filament. (D) Frontální řez stádiem 33 ukazující dvojici sekundárních filament odvětvujících se z primárního filamenta. (E) Frontální řez stádiem 33 ukazující trojici sekundárních filament odvětvujících se z primárního filamenta. (F) Příčný řez sekundárními filamenty jedince velikosti 18 mm. Kapilární smyčka se skládá z afferentní a efferentní části. (A) V rámečku SEM snímek příslušného stádia s vyznačenými rovinami řezů A, B.

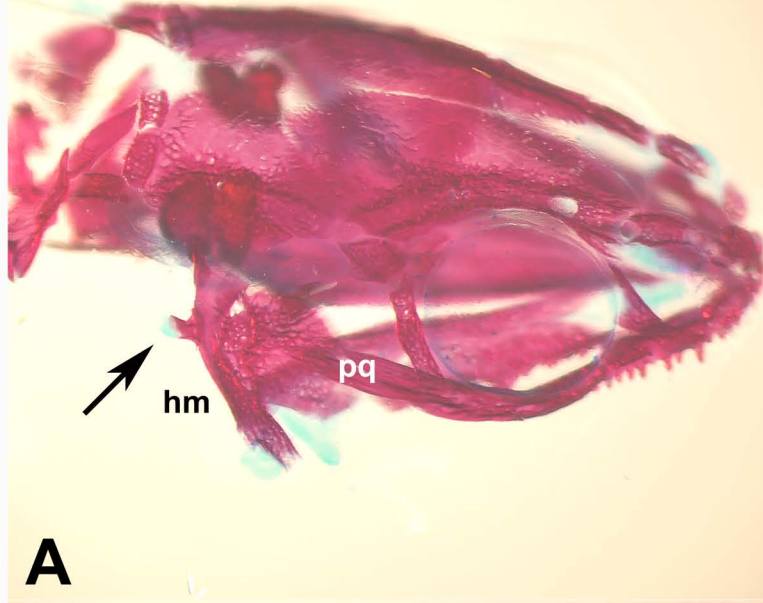


Tabule 4: Morfogenetické pochody v oblasti vnějších žaber druhu *Polypterus senegalus*, s důrazem na hranice epitelů značené protilátkou proti fibronektinu. (A) Horizontální řez ocasní částí těla ve stádiu 25. Ukázka značení fibronektinu v bazální lamině. (B) Frontální řez stádiem 25 v úrovni vnějších žaber. V místě vnějších žaber se hranice mezi epitelů nenaznačila a nelze je tak rozlišit. (C) Frontální řez shodným embryem, posteriorně od vnějších žaber. Epitel faryngu expanduje laterálně, ale nekontaktuje ektodermální vrstvu a bazální lamina mezi epitelů tak ještě není rozpuštěná. (D) Frontální řez shodným embryem nacházející se mezi řezy B a C. Dochází zde ke kontaktu entodermu s ektodermem, bazální lamina jinde naznačená je na styku těchto dvou vrstev rozpuštěná. (E) Shodný řez jako B. Autofluorescence žlutkových granul v červeném spektru jasně odlišuje entoderm, zasahující až k distálnímu konci vnějších žaber. (F) Horizontální řez stádiem 25. Entoderm expanduje do oblasti vnějších žaber samostatně, odděleně od prolamujícího se spirakula. (G) Horizontální řez stádiem 29. Vnitřek vnějších žaber je bazální laminou jasně oddělen od dvouvrstevného ektodermu na povrchu. Mezodermální svalstvo je naznačeno markerem 12/101. (A, C, D) Bílé šipky označují fibronektinem značenou bazální laminu. (B, E, F) Hroty označují laterálně expandující faryngeální entoderm. (F) Červená šipka označuje spirakulum.



Tabule 5: Projasněné skeletální preparáty lebky druhu *Polypterus senegalus*. (A) Laterální pohled na lebku jedince délky 32 mm. Spodní čelist byla odpreparována. (B) Laterální pohled na lebku jedince délky 39 mm. Spodní čelist byla odpreparována. (B') Detail preparátu z obrázku B. Kostěný operkulární výběžek je zakončen chrupavčitou ploškou. (A-B') Červená značí kostěné elementy, modrá značí chrupavky. (A, B) Šipka značí místo kde by se měla nacházet chrupavčitá výztuha vnějších žaber.

32 mm



A

39 mm



B

39 mm



B'

5.2 *Ambystoma mexicanum*

Tento druh byl do studie vybrán záměrně jako typický představitel obojživelníků, mající larvální stádium s celou řadou specializovaných adaptací, mezi něž patří i mnou studované vnější žábry, které jsou právě pro tuto skupinu tak charakteristické.

5.2.1 Vnější morfologie (SEM)

Pro obecné seznámení s celkovým vzhledem a utvářením této struktury jsem u axolotla, stejně jako u předchozího druhu, nejprve důkladně prostudovala vývoj vnějších žaber pod skenovacím elektronovým mikroskopem.

První náznak označující pozici budoucích vnějších žaber můžeme na axolotlovi pozorovat dlouho před jejich vznikem (zhruba od stádia 30) ve formě vybouleniny situované v branchiální oblasti. K rozdíferencování společného základu na tři části, odpovídající třem hlavním stonkům, dochází ve stádiu 35. Jednotlivé páry jsou jasně vymezené pomocí hlubokých zářezů a pozičně odpovídají I.-III. branchiálnímu oblouku, ke kterému se dále budou upínat (Tab. 6 B´´). Epidermální buňky na povrchu vnějších žaber jsou v té době ve srovnání s ostatními pokožkovými buňkami už o něco menší. Jednotlivé páry vnějších žaber se od té doby zhruba stejnoměrně prodlužují. Jak je vidět na obrázku (Tab. 6 C´´), dochází také ke zplošťování hlavních stonků, které tak nabývají spíše lístkovitého vzhledu. Dále se začne na všech párech tvořit výrůstek zakládajícího se primárního filamenta. Stádium 38 odpovídá fázi vývoje s vytvořenými dvěma filamenti uspořádanými v páru, naproti sobě, ve stejné vzdálenosti od báze hlavního stonku (Tab. 6 D´, D´´). S prodlužováním hlavních lístkovitých větví je více patrné početnější zastoupení buněk s ciliemi a celková menší velikost buněk na povrchu vnějších žaber (přibližně 20µm v porovnání s 30-40µm jinde lokalizovaných povrchových buněk). S dalším vývojem se celé vnější žábry prodlužují tak, že druhý a třetí pár jsou lehce delší, a i další páry primárních filament na nich přibývají rychleji. Ve stádiu 39 má první pár vnějších žaber dva páry primárních filament a druhý a třetí pár shodně po třech párech primárních filament. Stejně jako hlavní větve i odvětvující se filamenta začínají být na průřezu zploštělá. V dalším vývoji dochází k prodlužování a množování

filament (Tab. 6 E', E'') podle potřeb daného jedince, který si vnější žábry ponechává až do své „neotenické dospělosti“.

5.2.2 Histologie (JB-4)

Na histologických řezech jsem pozorovala jednotlivá stádia s cílem odhalit klíčové morfogenetické pochody, odehrávající se v dané oblasti a porozumět jejich vzájemnému kontextu a vlivu na vývoj vnějších žaber.

Místo vzniku budoucích vnějších žaber je na embryích axolotla dobře patrné již dlouho předtím, než se samotné žábry začnou diferencovat. Lehkou nerozčleněnou vybouleninu zahrnující základy všech tří stonků vnějších žaber můžeme pozorovat v oblasti laterálně situované od vyvíjejících se branchiálních oblouků I.-III., zhruba od stádia 31. Společný základ vnějších žaber se až do stádia 35 vyvíjí velmi pozvolna, jedinou pozorovatelnou změnou je postupné vystupování laterální vybouleniny dále od mediální osy těla (Tab. 7 A). Hlavním dějem odehrávajícím se ve faryngeální oblasti jsou morfogenetické pochody spojené s utvářením a diferenciací budoucího chrupavčitého vyztužení faryngu. Dochází zde k vychlípení entodermální vrstvy, již jde naproti zahlubující se ektoderm v místech budoucích žaberních štěrbin. Tyto dvě vrstvy mezi sebou uzavřou mezoderm a v takto vzniklém kanálu navíc proudí migrující buňky neurální lišty, které posléze obkrouží mezoderm uzavřený v centru a dají vznik chrupavkám žaberních oblouků (Tab. 7 B, B').

Ve stádiu 36-37 už jsou jednotlivé stonky vnějších žaber oddělené hlubokým zářezem vnějšího ektodermálního epitelu a začínají se navenek prodlužovat (Tab. 7 D). Na horizontálním řezu však není patrné, že by k prodlužování docházelo množováním vrstev ektodermu, jak se dosud myslelo. Dochází zde ale k výraznému protažení obloukového centra, ve kterém se nachází příslušná branchiální arterie a buňky odvozené od neurální lišty (Tab. 7 D').

Vnější žábry se následně rychle prodlužují a v místě jejich napojení začínají být patrná kondenzující ceratobranchilia – chrupavčité elementy žaberních oblouků (Tab. 8 A, B). Vnější žábry se připojují přímo na vnější hranu ceratobranchiálií, a proto tvoří tyto elementy přímou bariéru mezi entodermem faryngu a buněčnou populací utvářející lumen vnějších žaber (Tab. 8 B'). Vnitřní zárodečný list tedy do vnějších žaber nijak nepřispívá a je omezen

na oblast vymezenou branchiálními oblouky. Mezi těmito oblouky vysílá entoderm výběžky do míst žaberních štěrbin, tyto však jdou vždy ventrálním směrem a nikdy laterálně (Tab. 8 C).

U larvy velikosti 15 mm můžeme pozorovat, že vyvinuté chrupavky ceratobranchiálí reagují s použitým barvivem a výsledkem je typické fialovo-červené zbarvení, kondenzované extracelulární matrix (Tab. 8 E). Naproti tomu uvnitř vnějších žaber nic takového nenajdeme, jejich výplň tvoří pouze nepravidelně rozmístěné buňky, produkující řídkou extracelulární matrix slabě reagující s histologickým barvivem barvicím mukopolysacharidy (Tab. 8 F). Výsledná neurčitá pojivová tkáň je velmi podobná výplni vnějších žaber bichira (viz kapitola 5.1.2). Vnitřkem vnějších žaber probíhá sval, upínající se na příslušné ceratobranchiale (Tab. 8 F, G). Nepozorovala jsem, že by tento sval zabíhal i do odvětvujících se filament, důvodem však může být příliš mladé pozorované stádium a nemohu tedy říci, jaká je situace u starších jedinců s většími vnějšími žábry.

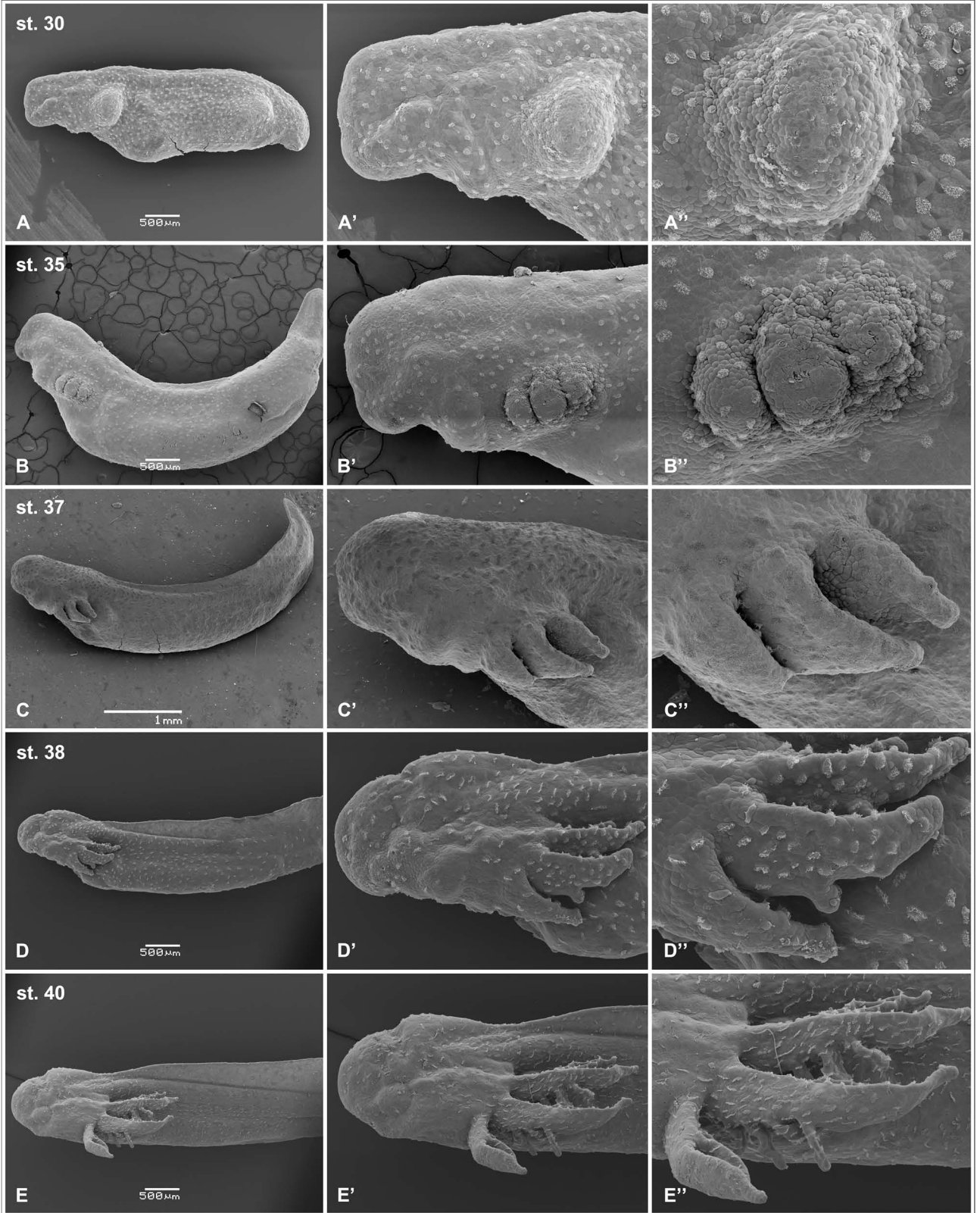
5.2.3 Značení populace buněk neurální lišty

Už na histologických řezech je vidět, že velkou část výplně vnějších žaber tvoří mezenchymatické buňky, obklopené množstvím extracelulární matrix. Buňka mezenchymu se vyznačuje velkým množstvím výběžků a tendencí k migraci a může mít původ ve dvou zárodečných vrstvách – mezodermu nebo neurální liště. Buňky neurální lišty vznikají během neurulace na rozhraní neurální trubice a ektodermu, který ji překrývá. Po prodělání epitelo-mezenchymální transice (Shook and Keller, 2003) začínají tyto buňky odmigrovávat a dávají vznik velkému množství hlavových a trupových tkání, proto jsou považovány za čtvrtou zárodečnou vrstvu (Hall, 2000). Buňky neurální lišty byly jasným kandidátem, protože právě do oblasti vznikajících branchiálních oblouků nesoucích vnější žábry jich namigrovává velké množství.

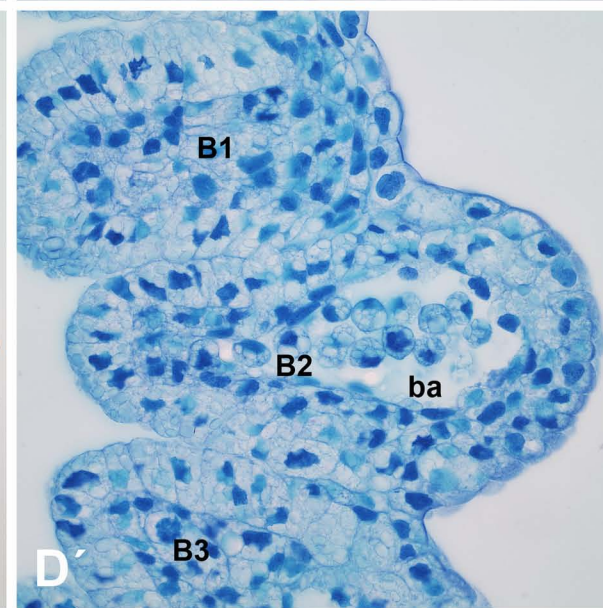
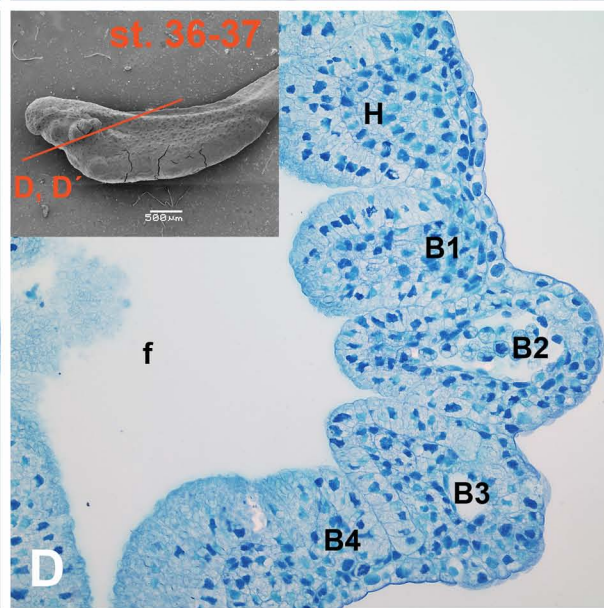
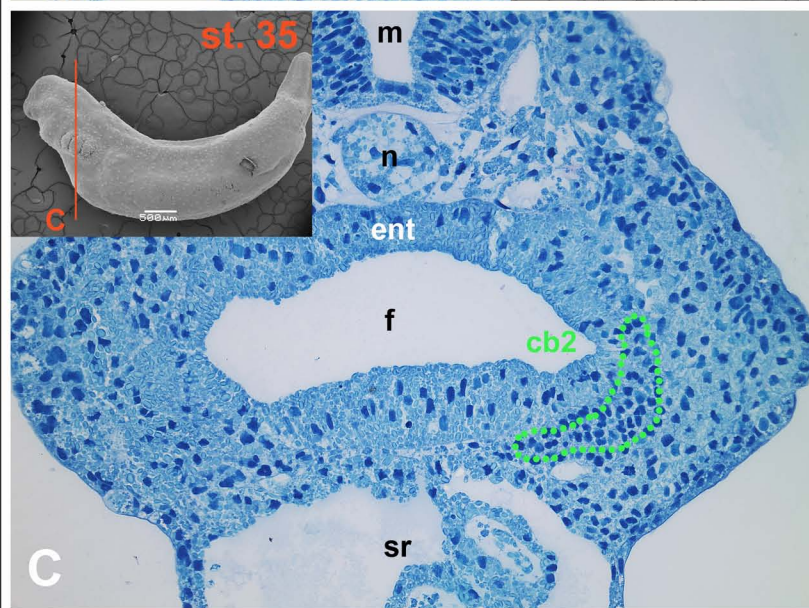
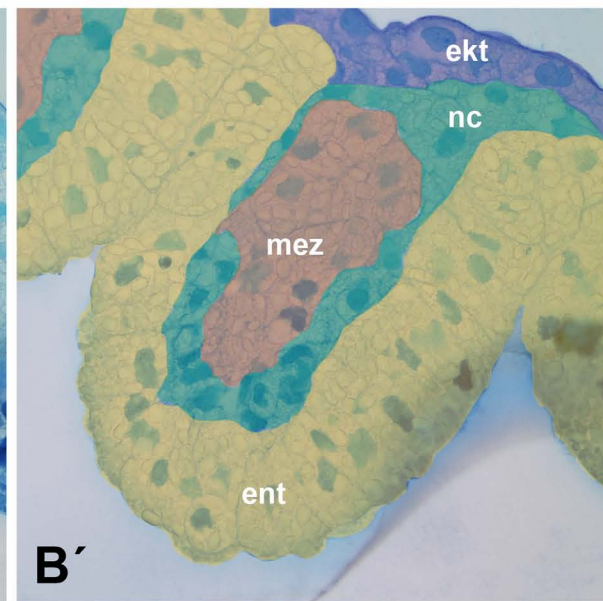
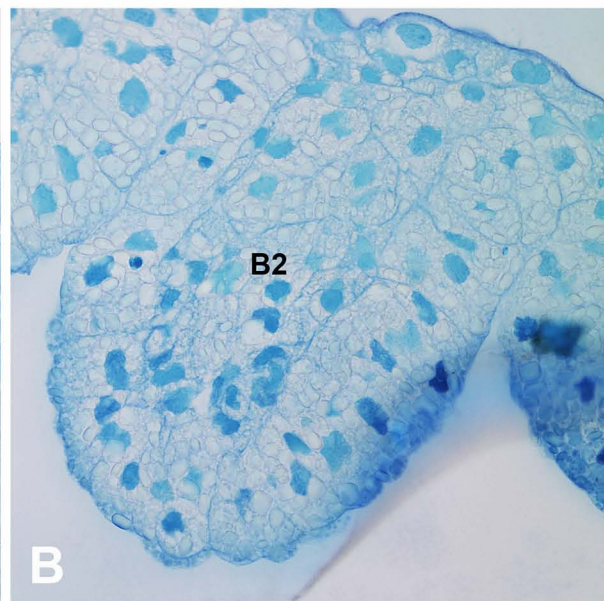
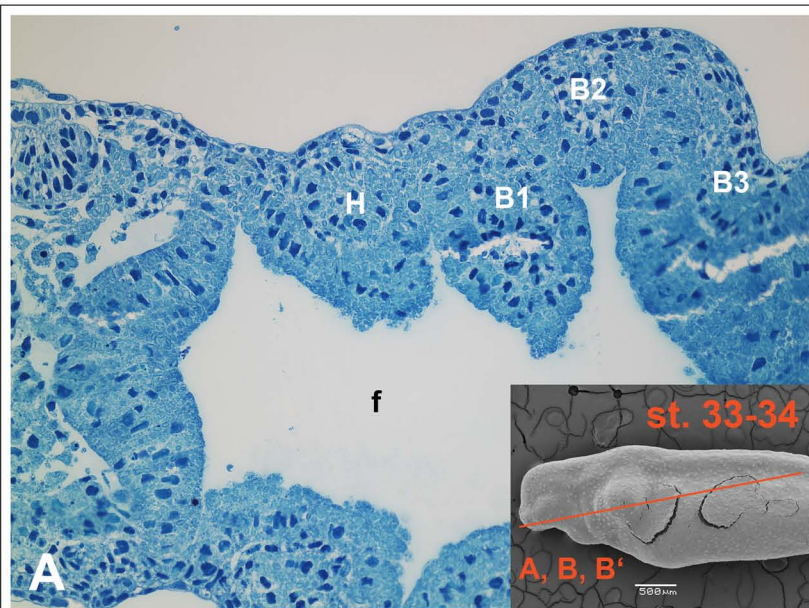
Axolotl je pro pozorování buněk neurální lišty dokonalým modelovým organismem, protože byla vyšlechtěna populace transgenních GFP mutantů, ze kterých lze transplantovat různé části tkání do normálních jedinců. Buňky GFP mutantů exprimují zelený fluorescenční protein a jejich osud lze v novém embryu dále sledovat. Moje kolegyně L. Kloučková takto označila populaci buněk neurální lišty a při pozorování larev, které se nechaly dále vyvinout vyšlo

najevo, že neurální lišta přispívá i do vnějších žaber, což doposud nebylo známo. Její data jsem měla možnost reanalyzovat a prostudovat ze svého úhlu pohledu, zaměřeného právě na vnější žábry. Tato nová analýza prokázala, že naprostá většina buněk mezenychmatické výplně vnějších žaber exprimuje zelený fluorescenční protein a pochází tedy z transgenních jedinců, respektive z buněčné populace transplantovaných neurálních valů (Tab. 9 A, B). Mimo tyto buňky odvozené od neurální lišty, můžeme uvnitř vnějších žaber pozorovat ještě svalová vlákna mezodermálního původu, naznačená markerem 12/101 značícím mezodermální svalstvo (Tab. 9 B').

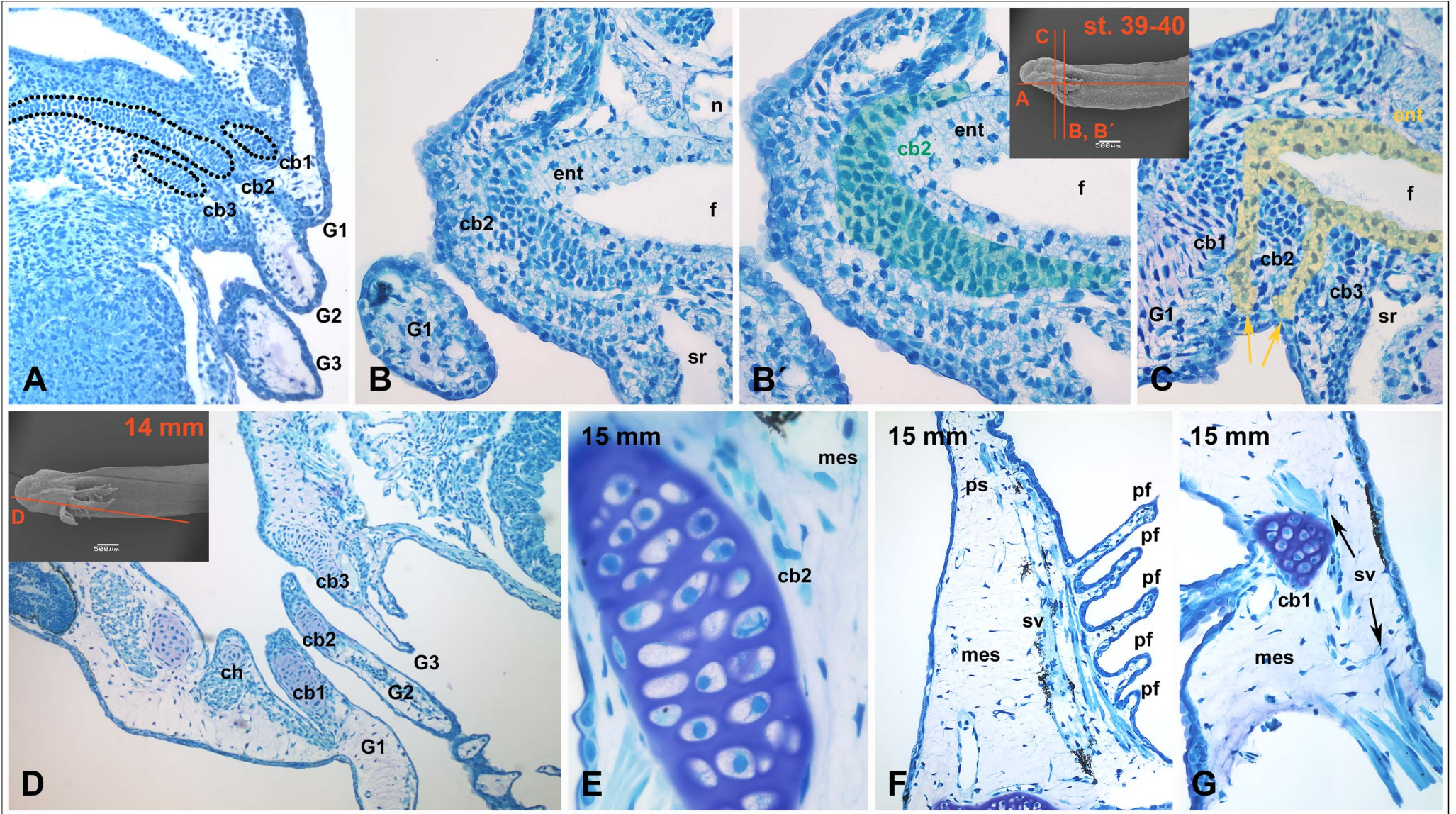
Tabule 6: Tabulka externího vývoje vnějších žaber druhu *Ambystoma mexicanum*. (A-E) Celkový laterální pohled na jednotlivá stádia s vnějšími žabrami diferencujícími se v branchiální oblasti. (A'-E') Bližší pohled z laterální strany na hlavu embrya (resp. larvy) s vnějšími žabrami. (A''-E'') Detail vnějších žaber. Nejprve vzniká pouze jediný společný základ, ze kterého až později vznikají tři oddělené stonky odpovídající třem párům vnějších žaber. Posterornější páry jsou delší než pár anteriorní a nesou více primárních filament.



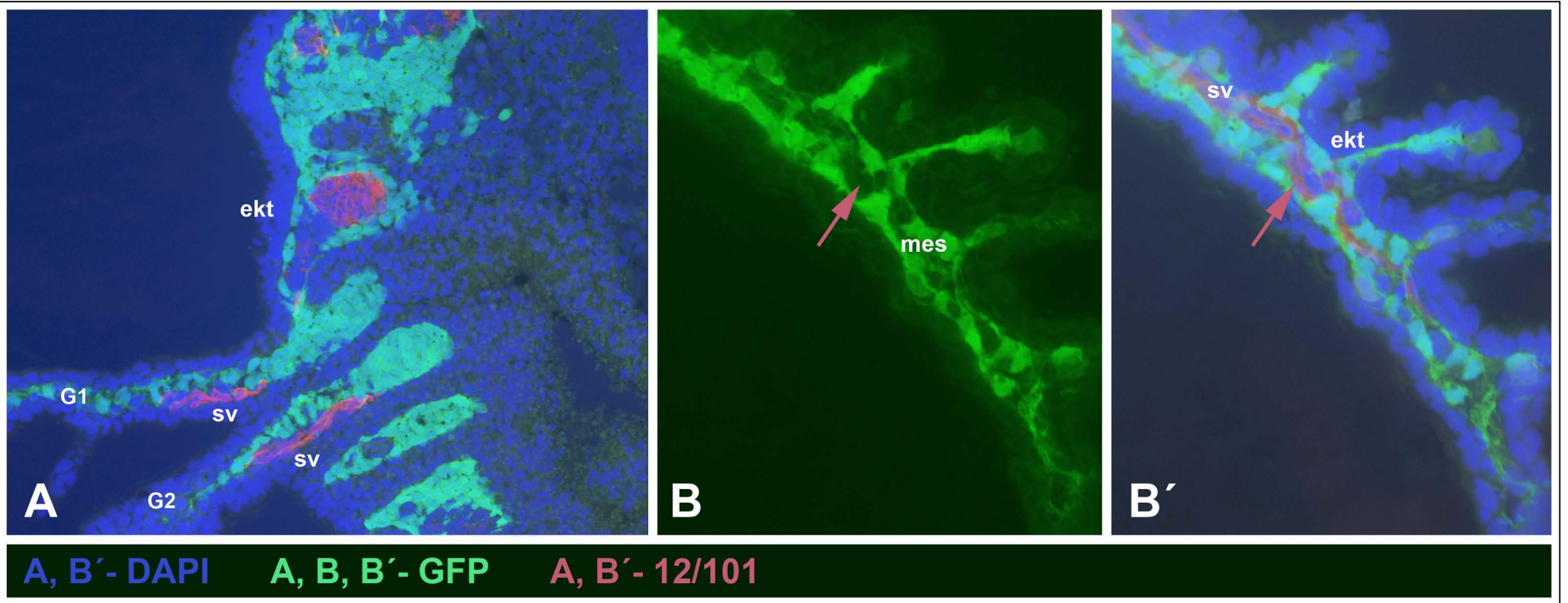
Tabule 7: Morfogeneze raného vývoje vnějších žaber druhu *Ambystoma mexicanum* na histologických řezech. (A) Horizontální řez stádiem 33-34 v oblasti vznikajících žaberních oblouků. (B) Horizontální řez stádiem 33-34, detail vyvíjejícího se oblouku. (B´) Předchozí řez s vyznačenými embryonálními vrstvami – entoderm (žlutá), ektoderm (modrá), mezoderm (červená), neurální lišta (zelená). (C) Frontální řez stádiem 35, oblast druhého páru vnějších žaber s kondenzujícím ceratobranchialiem z buněk neurální lišty. (D) Horizontální řez stádiem 36-37, pokračující diferenciaci žaberních oblouků. (D´) Detail předchozího řezu s branciální aortou vyplňující téměř celé obloukové centrum. (A, C, D) V rámečku SEM snímek příslušného stádia s vyznačenou rovinou řezu.



Tabule 8: Tkáňová diferenciacie v pokročilé fázi vývoje vnějších žaber druhu *Ambystoma mexicanum* na histologických řezech. (A) Horizontální řez stádiem 39-40 v oblasti kondenzujících chrupavek jednotlivých ceratobranchiálií (ohraničeno černými tečkami). (B) Frontální řez stádiem 39-40 – farynx z boku ohraničen vznikajícím ceratobranchialiem. (B') Detail předchozího řezu s vyznačenými buňkami neurální lišty (zelená), ohraničujícími entoderm faryngu. (C) Anteriornější frontální řez stádiem 39-40 s ventrálně vyvíjejícím entodermem (žluté šipky) směrem k žaberním štěrbinám. (D) Horizontální řez jedincem velikosti 14 mm. (E) Řez chrupavkou ceratobranchialia u jedince velikosti 15 mm. (F) Řez vnější žábrou u jedince velikosti 15 mm. Vnější žábry vyplňuje řídký mesenchym produkující extracelulární matrix. (G) Řez vnější žábrou u jedince velikosti 15 mm v oblasti úponu svalů vnějších žaber na ceratobranchialium. (B', D) V rámečku SEM snímek příslušného stádia s vyznačenými rovinami řezů.



Tabule 9: Vizualizace buněk neurální lišty ve vnějších žábřácích druhu *Ambystoma mexicanum* na kryostatových řezech. (A) Horizontální řez oblastí vnějších žaber, buňky uvnitř vnějších žaber jsou původu neurální lišty, narozdíl od buněk povrchového epitelu. (B) Řez hlavním stonkem vnějších žaber. Kromě buněk exprimujících GFP, najdeme uvnitř vnějších žaber i buňky, které GFP neexprimují (červená šipka), tudíž nejsou původu neurální lišty. (B') Shodný řez jako B, navíc vizualizováno mezodermální svalstvo a buněčná jádra. Buňky, které neexprimují GFP jsou svalové buňky mezodermálního původu (červená šipka).



5.3 *Misgurnus fossilis*

Piskoř je typický představitel čeledi Cobitidae, jehož larva má přídatné dýchací struktury nazývané vnější žaberní filamenta. Tato struktura, sama o sobě velmi zajímavá, začne být ještě zajímavější, pokud ji jako vnější dýchací strukturu začneme srovnávat s vnějšími žábry.

5.3.1 Vnější morfologie (SEM)

Vnější žaberní filamenta piskoře jsou přechodnou dýchací strukturou, jako takové se vyvíjejí a posléze zanikají velmi rychle a brzy jejich funkci nahrazují jiné dýchací struktury, jako třeba segmentální cévy ploutevního lemu (Kostomarova, 1991; Kryžanovskij, 1949). Ačkoliv se s komplexností vnějších žaber bichira nebo axolotla nedají srovnávat, pozorování jejich externího vývoje ukáže mnohé podobnosti.

Základy prvních filament můžeme na povrchu embrya pozorovat ve stádiu 38, jedná se o filamenta zakládající se na I. a II. branchiálním oblouku (Tab. 10 A', A''). Pozičně se filamenta zakládají přesně laterálně od vznikajících elementů žaberních oblouků, z ektodermálního povrchového materiálu. Před prvním filamentem je pozorovatelný vznikající operkulární záhyb a prolamující se první žaberní štěrbina. Mezi filameny je pozorovatelný zářez budoucí druhé žaberní štěrby. Ve stádiu 39 již nalezeneme po jednom filamentu na všech čtyřech branchiálních obloucích, přičemž anteriorní dvě jsou značně delší (Tab. 10 B''). Následně se zakládají další žaberní filamenta postupně od anteriorních oblouků, ventrálně od těch již vzniklých. Epitel na povrchu filament je velmi tenký a buňky jsou oproti normálnímu ektodermu plošší a větší. Důvodem tohoto rozdílu je patrně rychlý růst filament, při kterém se buňky nestíhají dělit, proto se ve snaze zvětšit svojí velikost zplošťují. Ve stádiu 40 je branchiální oblast překryta operkulárním kožním záhybem a znemožňuje tak pozorování vývoje filament od jejich báze. Obecně dochází k prodlužování stávajících a vzniku nových filament během celého stádia 40, ve kterém dosahují vnější žaberní filamenta maximálního vývoje (Tab. 10 D'). Narozdíl od vnějších žaber, nenajdeme u vnějších žaberních filament nikdy větvení, filamenta se zakládají vždy každé zvlášť ze svého vlastního základu. Pro lepší pozorování situace na bázi žaberních filament, v místě jejich připojení

na žaberní oblouk, byl před přípravou vzorku stádia 40 pro SEM techniku odstraněn operkulární záhyb. Na takto upravené larvě piskoře můžeme pozorovat zhruba deset jednotlivých filament, v různé fázi prodloužení (od dlouhých až po nově vznikající), příslušejících k I. branchiálnímu oblouku (Tab. 11 A´). Na II. branchiálním oblouku najdeme kolem osmi filament a menší počet potom na III. a IV. branchiálním oblouku. Všechny žaberní štěrby jsou otevřené do vnějšího prostředí a kromě vnějších žaberních filament zde není pozorován žádný jiný materiál, ze kterého by potenciálně mohly vznikat vnitřní žábry. Vnější žaberní filamenta jsou stále v přesně laterální pozici od branchiálního oblouku a není patrné, že by se nějak zahlubovala, či integrovala do vnitřního faryngo-branchiálního prostoru.

Stádiem 41 počíná velmi rychlé zkracování filament a brzy nejsou z vnějšku pozorovatelná. Filamenta ve zkrácené podobě však dále zůstávají přítomna na branchiálních obloucích, jsou jen zcela překryta operkulárním kožním záhybem. Během dalšího vývoje dochází k množování filament a postupně dochází i k jejich větvení (Tab. 11 B´). Tato filamenta mají i nadále respirační funkci a v této podobě je nazýváme vnitřními žabrami. Výše popsany vývoj dokumentuje vznik vnějších žaberních filament a jejich následnou kontinuální přeměnu ve filamenta vnitřních žaber, můžeme tedy o nich uvažovat jako o jediné struktuře.

5.3.2 Histologie (JB-4)

Existuje více názorů na vývoj žaberních filament u těchto druhů, kde se kromě klasických filament vnitřních žaber vyskytují i ta vnější. Proto jsou histologické řezy v tomto případě velmi důležité pro posouzení embryonálního původu vnějších žaberních filament.

Ještě než se zformují první filamenta na I. a II. branchiálním oblouku, lze pozorovat v daném místě lehké vyboulení (stádium 37). Jedná se o ztlustění povrchového ektodermu, pod nímž se nachází vrstva mezenchymu původu mezodermálního nebo z neurální lišty. Ještě pod mezenchymem je jasně patrný, viditelně ohraničený epitel faryngu, původu entodermálního (Tab. 12 A). Během celého raného vývoje je zřejmé, že na vzniku vybouleniny budoucího filamenta se faryngeální entoderm nepodílí (Tab. 12 A´).

Ve stádiu 38 již můžeme pozorovat první vnější žaberní filamentum tvořené typickými buňkami povrchového epitelu (Tab. 12 B). Anteriorně od něj se nachází žaberní štěrbina a dochází zde k přímému kontaktu vnější a vnitřní zárodečné vrstvy, k otevření entodermálního faryngu do vnějšího prostředí.

Postupně s prodlužováním stávajících a vznikem posteriornějších filament se během stádia 39 prolamují i posteriornější žaberní štěrby (Tab. 12 C). Na povrchu filament se nachází ektodermální epitel s typickými zašpičatělými výběžky, čtenějšími u buněk na bázi filament. S tím jak buňky na distálním konci filament v důsledku růstu zvětšují plochu své apikální membrány, dochází i ke zplošťování tohoto povrchu.

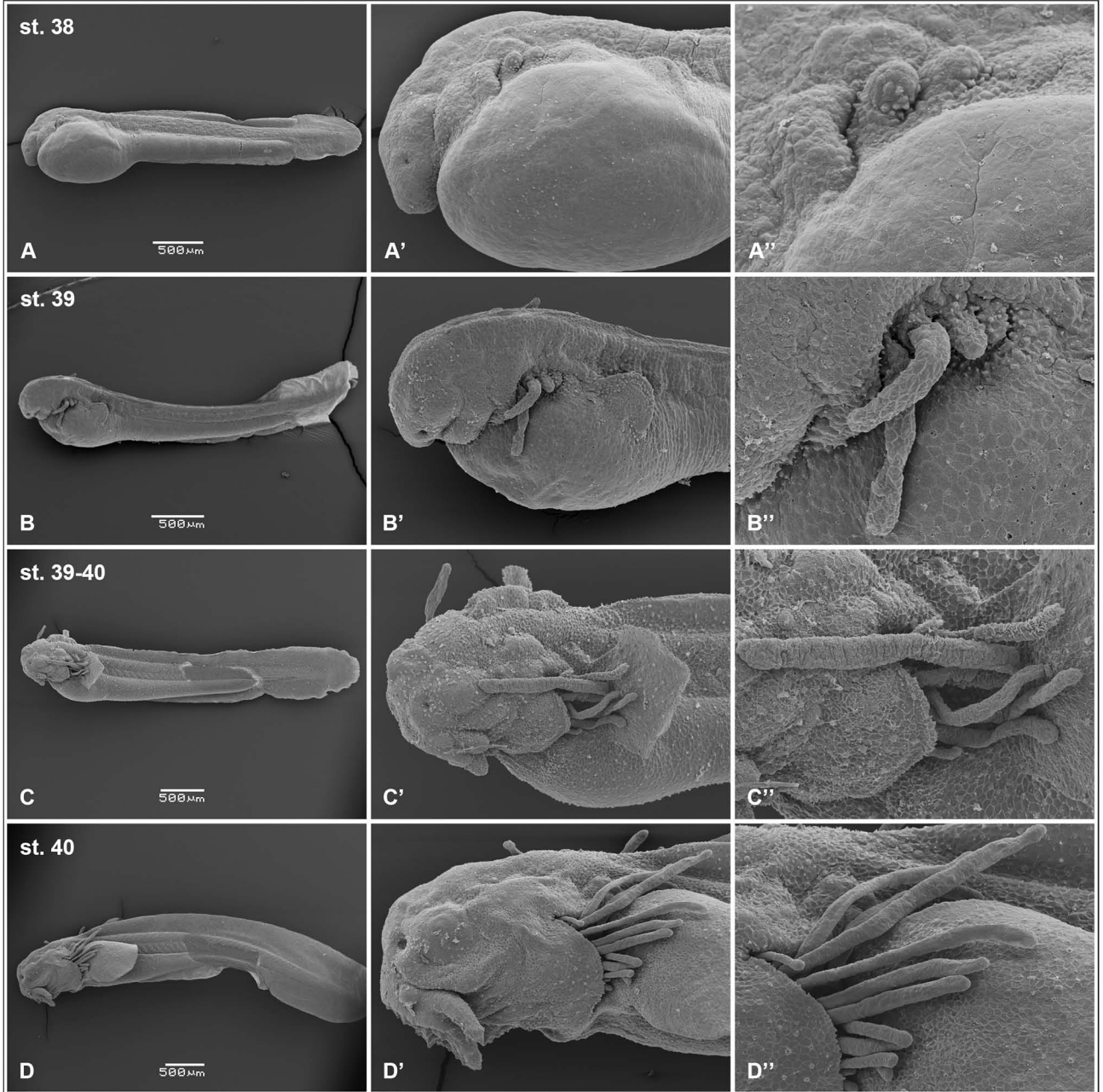
Mezi stádii 39 a 40 dochází k velmi rychlému prodlužování filament, která postupně přerůstají operkulárním záhybem, a ke vzniku dalších filament, zakládajících se na branchiálních obloucích ventrálně od těch stávajících. V této době již také můžeme pozorovat kapilární smyčky tvořené afferentní a efferentní částí, prokrvující filamenta (Tab. 13 B).

Stádium 40 je stádiem maximálního vývoje vnějších žaberních filament a na řezu lze pozorovat kolem pěti až šesti filament na I. (Tab. 13 C) a II. branchiálním oblouku. Na III. a IV. oblouku je filament vzhledem k pozdějšímu vývoji méně. Branchiální oblouky jsou již v této době vyztuženy plně kondenzovanými chrupavkami, s buňkami zalitými ve fialově se barvící extracelulární matrix. Uvnitř vnějších žaberních filament se nacházejí pouze dva buněčné typy – krevní buňky a buňky tvořící endotel kapilár. Žádné buňky, produkující extracelulární matrix, sloužící k vyztužení, jsem uvnitř vnějších žaberních filament nenalezla (Tab. 13 B). Taktéž nejsou filamenta vyztužena ani pomocí svalových vláken, dá se tedy předpokládat, že larva piskoře s nimi cíleně nepohybuje. U tohoto nejstaršího jedince není na histologických řezech patrné, že by v branchiální oblasti vznikala nějaká jiná tkáň budoucích vnitřních žaber, ke kterým by se filamenta mohla později připojit. Pozice vnějších filament je i nadále přesně laterální od chrupavčitých elementů branchiálních oblouků.

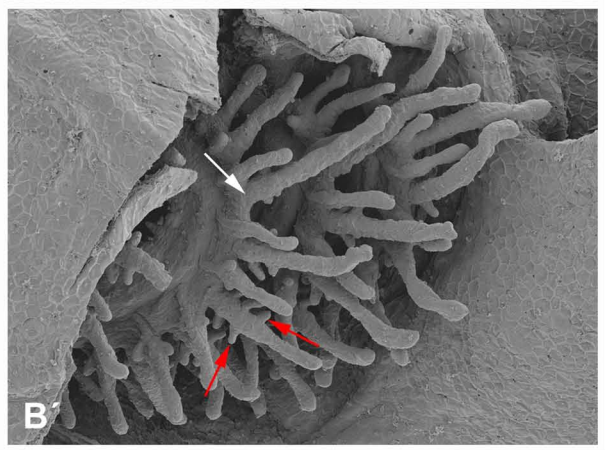
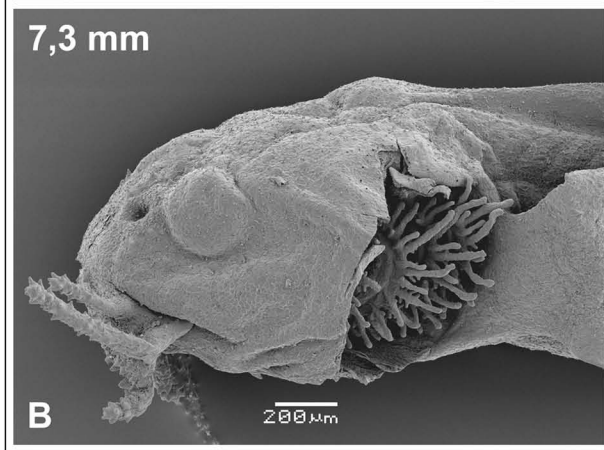
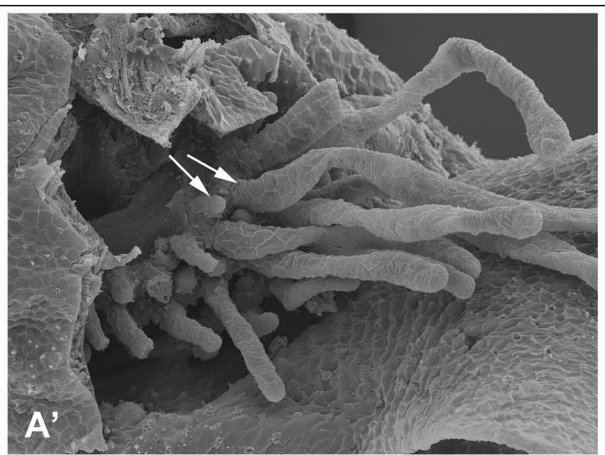
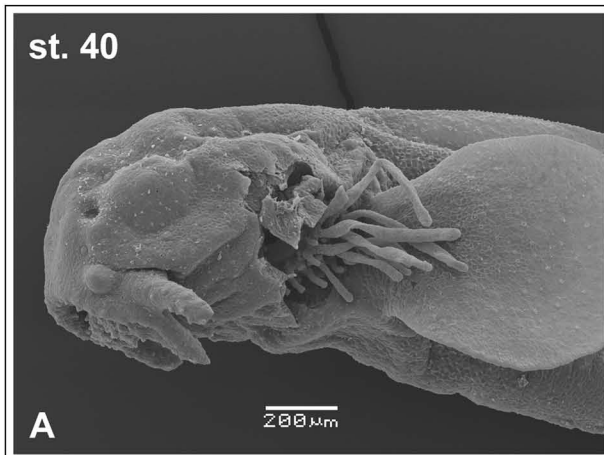
V následném vývoji se filamenta začínají zkracovat a brzy nejsou z vnějšku vůbec pozorovatelná, na řezu starší larvy (7,3 mm), však můžeme v oblasti pod operkulárním záhybem pozorovat stále velké množství histologicky shodných filament (Tab. 13 D, F), jak jsem již ukázala na snímcích z elektronového mikroskopu. Jejich pozice se zdá nezměněná a jediný rozdíl je

tak v počtu a délce těchto filament. Původní delší a méně početná vnější žaberní filamenta tedy dají vznik filamentům pravých vnitřních žaber. Nová filamenta potom vznikají shodně, jako vznikala vnější filamenta, z původně ektodermálního materiálu, který se teprve sekundárně, po překrytí operkulem, dostal do vnitřního prostoru.

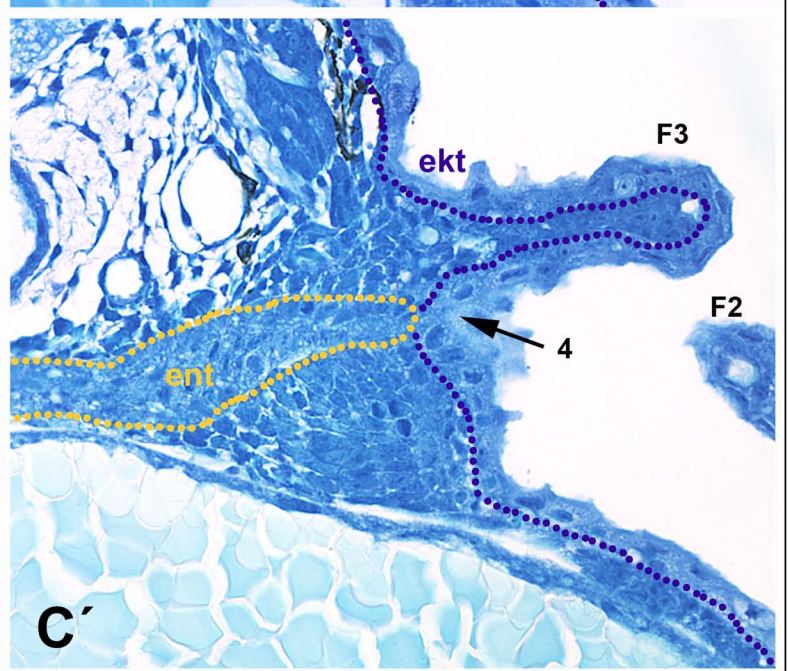
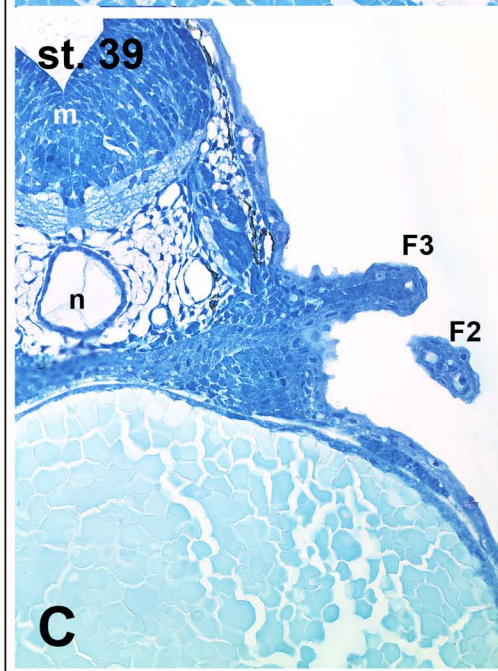
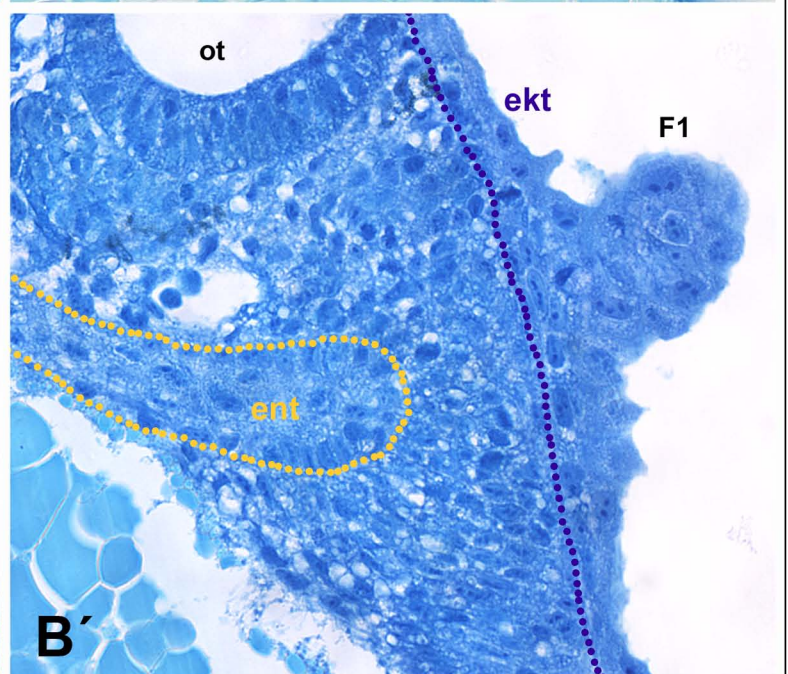
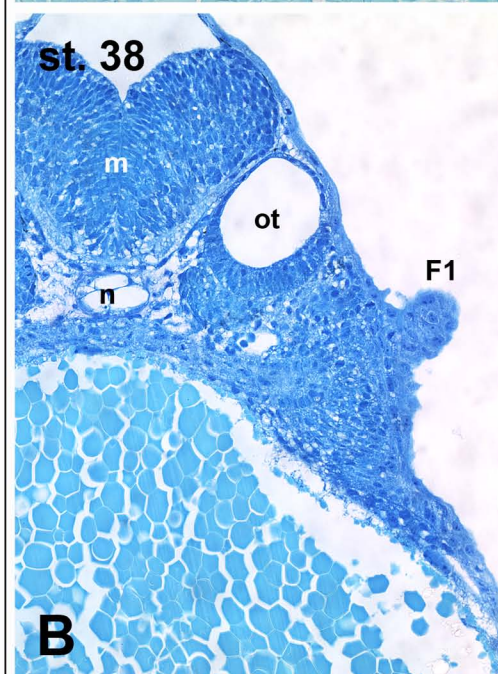
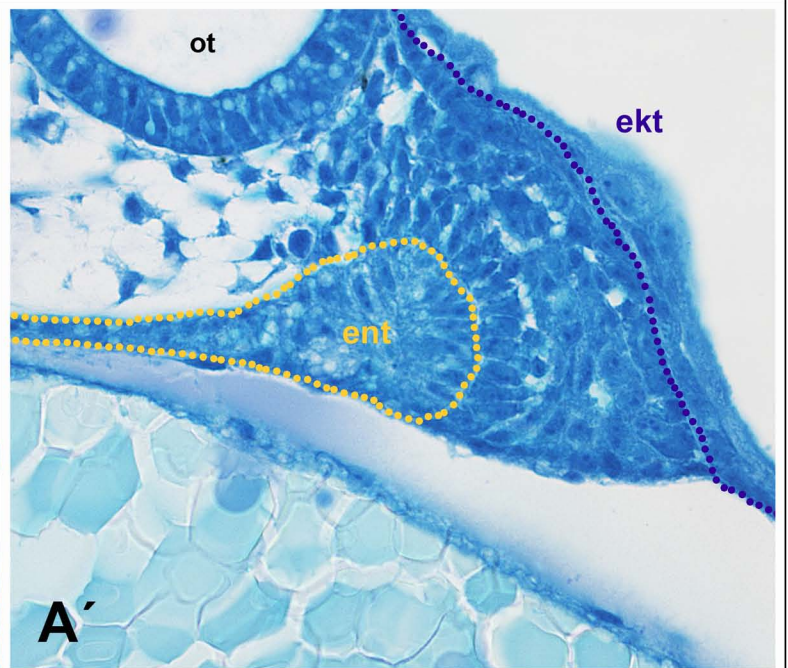
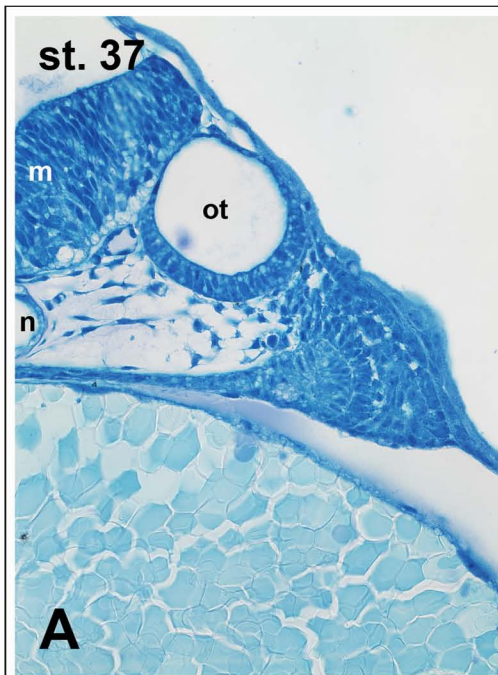
Tabule 10: Tabulka externího vývoje vnějších žaberních filament druhu *Misgurnus fossilis*. (A-D) Celkový laterální pohled na jednotlivá stádia s vnějšími žaberními filamenty diferencujícími se v branchiální oblasti posléze překryté operkulárním záhybem. (A'-D') Bližší pohled z laterální strany na hlavu embrya (resp. larvy) s vnějšími žaberními filamenty. (A''-D'') Detail vnějších žaberních filament. Každé filamentum vzniká samostatně ze svého vlastního základu na příslušném branchiálním oblouku. Dorzální filamenta jsou nejdelší.



Tabule 11: Detail vnější morfologie žaberní oblasti druhu *Misgurnus fossilis* po překrytí operkulem. (A) Celkový laterální pohled na vnější žaberní filamenta u stádia 40 po odstranění operkulárního záhybu. (A') Detail žaberní oblasti ze snímku A. Bílé šipky označují vyvinuté i nově vznikající filamenta. (B) Celkový laterální pohled na larvu velikosti 7,3 mm po odstranění operkulárního záhybu, který za normálních okolností překrývá filamenta úplně, tak že je z vnějšku nelze pozorovat. (B') Detail žaberní oblasti ze snímku B. Nyní vnitřní filamenta jsou početnější a začínají se sekundárně větvit (červené šipky).

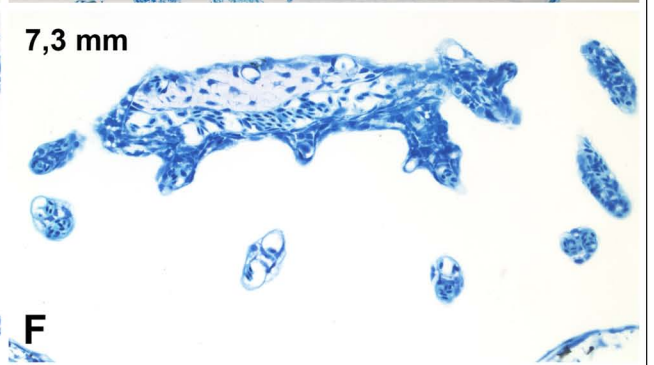
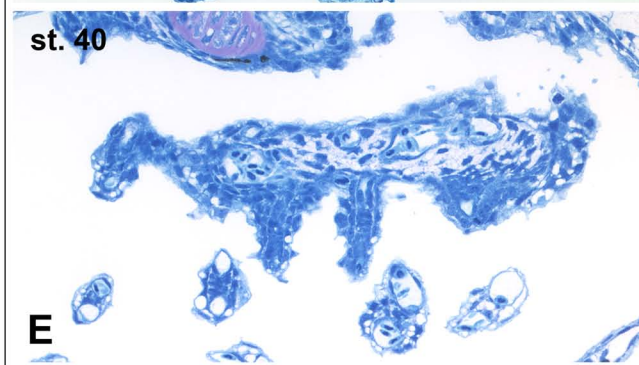
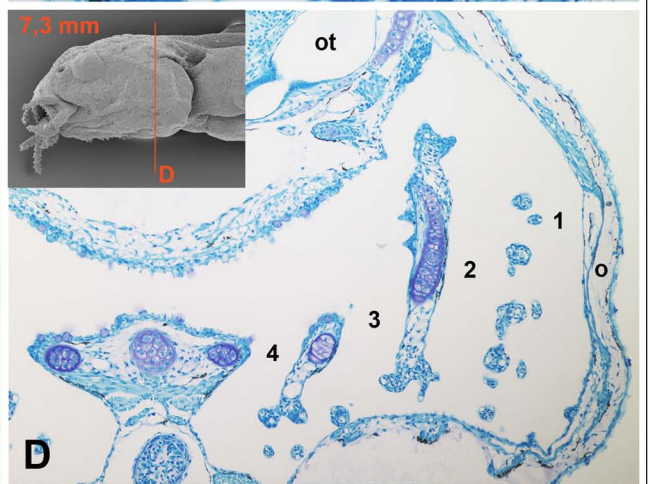
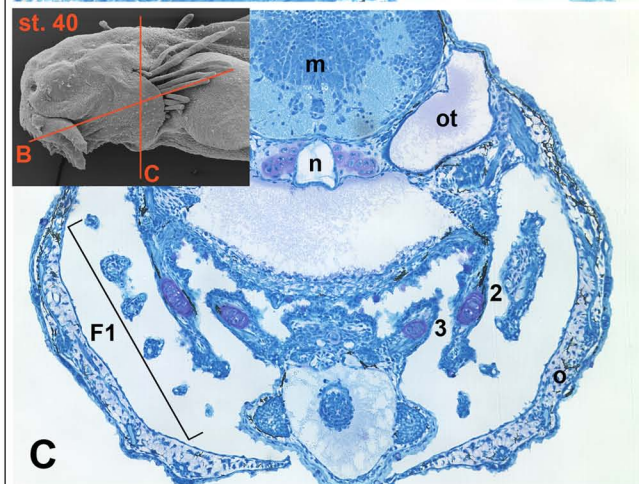
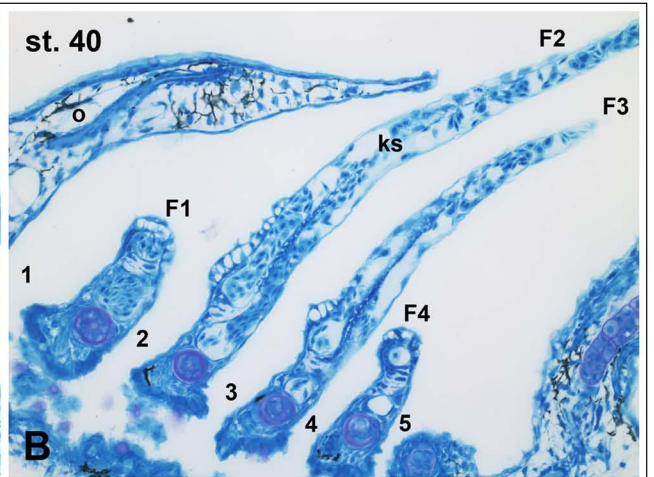
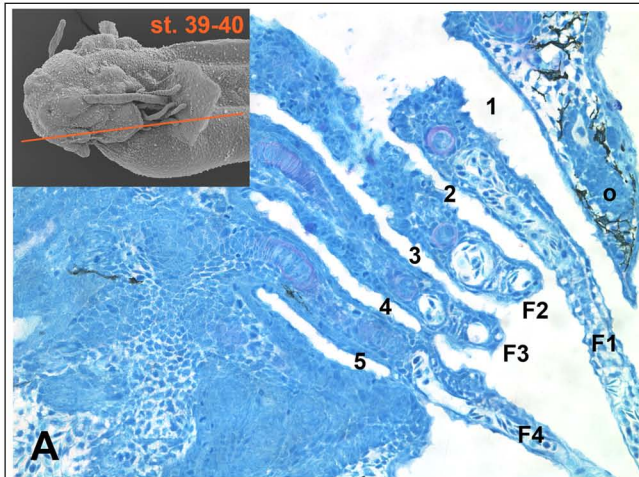


Tabule 12: Raná morfogeneze oblasti vnějších žaberních filament druhu *Misgurnus fossilis*. (A) Frontální řez stádiem 37 oblastí vznikajícího prvního filamenta. (A') Detail předchozího řezu se zvýrazněnými hranicemi entodermu (žlutá tečkovaná linka) a ektodermu (modrá tečkovaná linka), mezi kterými nedochází ke kontaktu. (B) Frontální řez stádiem 38 oblastí prvního filamenta. (B') Detail předchozího řezu se zvýrazněným entodermem a ektodermem, ze kterého vzniká filamentum. (C) Frontální řez stádiem 39 v místě třetího filamenta, se zachycenou žaberní štěrbinou. (C') Detail předchozího řezu se zvýrazněným ektodermem a entodermem. V místě žaberní štěrbiny (označené šipkou) dochází ke kontaktu.



Tabule 13: Pozdější vývoj žaberní oblasti druhu *Misgurnus fossilis*.

(A) Horizontální řez stádiem 39-40 se zachycenými žaberními štěrbinami, mezi jednotlivými oblouky s filamenty. (B) Horizontální řez stádiem 40. Filamenta tvoří pouze kapilární smyčka a tenký povrchový epitel. (C) Frontální řez stádiem 40. Od jednotlivých oblouků odstupuje více filament. (D) Frontální řez jedincem velikosti 7,3 mm, který již nemá vnější žaberní filamenta. Od jednotlivých oblouků odstupují shodná filamenta jako ve stádiu 40. (E) Řez branchiálním obloukem ve stádiu 40 s odsupujícími vnějšími žaberními filamenty. (F) Řez branchiálním obloukem u jedince velikosti 7,3 mm s odsupujícími vnitřními žaberními filamenty. (A, C, D) V rámečku SEM snímek příslušného stádia s vyznačenými rovinami řezů.



6 Diskuze

V předchozí kapitole jsou shrnuta má data získaná studiem vnějších respiračních struktur raných ontogenetických stádií vybraných druhů obratlovců. V této kapitole budu srovnávat své výsledky s tvrzeními ostatních autorů, kteří se tímto tématem v minulosti již zabývali, a pokusím se interpretovat získaná data v širším kontextu a vyjádřit se k homologii mnou studovaných struktur na různých úrovních.

6.1 Vnější žábry bichirů (Polypteriformes)

Jak jsem již shrnula výše (viz kapitola 2.3), najdeme u bichira mnoho unikátních znaků, a proto odedávna přitahoval pozornost vědců. Pro své nejasné zařazení byl dlouho označován „živoucí fosilií“ (Hall, 2001), jiní v něm zase, díky podobnostem vývoje s obojživelníky a bahníky, viděli chybějící spojovací článek mezi rybou a obojživelníkem (Kerr, 1903). I dnes, poté co byl bichir zařazen na bázi linie Actinopterygii (Patterson, 1982; Gardiner et al., 2005), nám toho může mnoho povědět o stavu znaků, jaký mohl být na počátcích linie Actinopterygii.

V rámci linie Actinopterygii je bichir jedinou rybou, jehož larva má jako přídatný dýchací orgán vnější žábry, naprosto srovnatelné s vnějšími žábry jejich typických nositelů – obojživelníků. Tento stav znaku má za následek protichůdné názory objevující se v literatuře – někteří považují vnější žábry bichira za homologní vnějším žábrám v ostatních skupinách (Kerr, 1903; Budgett, 1901; Schmalhausen, 1968), jiní je staví úplně mimo jako samostatně vzniklou strukturu (Witzmann, 2004; Schoch & Witzmann, 2011), a nebo se otázkami jejich vzniku nezabývají vůbec (Gegenbaur, 1878; Goodrich, 1958). Ve své práci jsem se zaměřila právě na ty znaky, které odlišují vnější žábry bichira od ostatních a pokusila se zhodnotit závažnost a možné příčiny této odlišnosti.

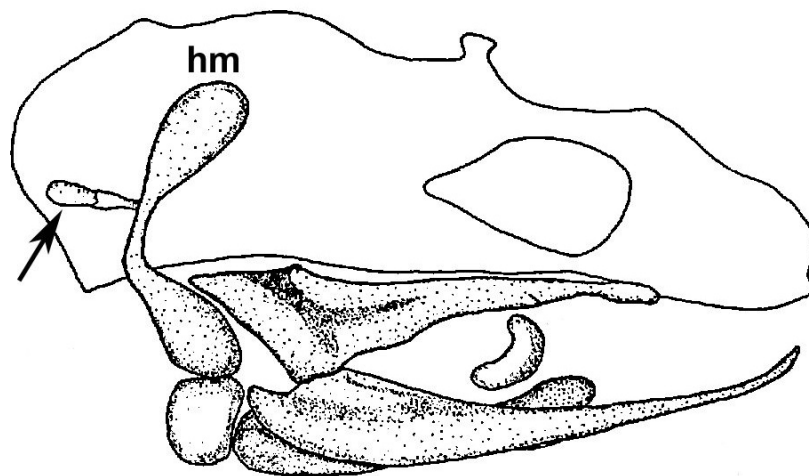
Na první pohled je zřejmým rozdílem přítomnost pouze jediného páru vnějších žaber, navíc ještě netradičně umístěného na hyoidním oblouku, proto se zde pokusím shrnout příčiny a důvody, proč by tomu tak mohlo být. V ancestrálním stavu jsou u obojživelníků přítomny tři páry (Duellman & Trueb,

1986; Witzmann, 2004) a u bahníků čtyři páry vnějších žaber (Rauther, 1937; Schmalhausen, 1968), vždy asociované s branchiálními oblouky.

Důvodem nepřítomnosti vnějších žaber na branchiálních obloucích by u bichira podle některých autorů měla být přítomnost masivního osifikovaného operkula, které může vnějším žábřám ve vývoji na žaberních obloucích bránit (Rauther, 1937; Witzmann, 2004). Hyoidní oblouk by pak zůstal jediným volným a to by současně vysvětlovalo i přítomnost pouhého jediného páru vnějších žaber. Podle mých pozorování však tato skutečnost nehraje během vývoje vnějších žaber bichira žádnou roli, jednoduše proto, že k jejich vzniku dochází tak časně během embryonálního vývoje, že operkulum jako dermální kost zatím vůbec není přítomno. Dokonce můžeme u starších larválních stádií pozorovat přítomnost vyztužených epidermálních lemů na branchiálních obloucích (viz kapitola 5.1.2), které na řezu vypadají velmi podobně jako hyoidní vnější žábřa. Dobrým důvodem pro asociaci vnějších žaber s hyoidním obloukem však může být urychlený vývoj tohoto oblouku u bichira a skutečnost, že se obecně diferencuje dříve než oblouky branchiální, protože proudy neurální lišty, dávající vznik chrupavkám žaberních oblouků, obecně odmigrovávají v antero-posteriorním sledu (Bronner-Fraser, 1994). Přesný pattern migrace jednotlivých proudů je druhově specifický, a proto bych navrhovala podívat se podrobně na situaci u bichira, protože předběžné výsledky kolegy J. Štundla naznačují, že velikost buněčné populace hyoidního proudu neurální lišty má spojitost s přítomností vnějších žaber na hyoidním oblouku (J. Štundl, osobní sdělení). Shodně i hyoidní aortální oblouk je první, který se vyvíjí (st. 28; Kerr, 1903) a začíná jím cirkulovat krev (st. 30; Diedhiou & Bartsch, 2009). Posteriořejší aortální oblouky se vyvíjejí až se značným zpožděním (od st. 31; Kerr, 1903). Při tak brzkém vývoji vnějších žaber, prakticky hned po neurulaci (Diedhiou & Bartsch, 2009), může i nepatrná urychlenost hyoidního oblouku být výhodnější pro připojení a prokrvení jediné respirační struktury embrya. Ve svém dalším vývoji se poté vnější žábry bichira hustě větví a co do výsledného objemu si nezadají s třemi páry vnějších žaber obojživelníků. Zdá se, že je tento jediný pár schopný stejně dobře splňovat respirační nároky, jako jinde tři páry.

V literatuře se hojně uvádí, že vnější žábry bichira jsou vyztuženy pomocí chrupavčité tyčinky (Witzmann, 2004; Moy-Thomas, 1933; Budgett, 1901c), která nebyla nikdy blíže prozkoumána, a proto jsem se na její popsání chtěla ve

své práci zaměřit. Zjistila jsem však, že během larválního vývoje jsou žábry vyztuženy pouze neurčitou pojivovou tkání z extracelulární matrix, kterou produkují řídce rozmístěné mezenchymatické buňky (viz kapitola 5.1.2, Tab. 3), stejně jako je tomu u axolotla (viz kapitola 5.2.2, Tab. 8). Že by zde docházelo k nahuštění a kondenzaci buněk nutné pro vznik chrupavky, jsem nepozorovala. Vyobrazení této chrupavčité tyčinky se nachází v práci Budgetta (Budgett, 1901c), je však poměrně nepřehledné. Zjednodušenou převzatou verzí toho samého najdeme u Moy-Thomase (Moy-Thomas, 1933) u larvy délky 30 mm (Obr. 1). Já jsem však nic takového u jedinců velikosti 32 a 39 mm, stále nesoucích vnější žábry, nenalezla (viz kapitola 5.1.4, Tab. 5), stejně jako autoři studie zabývající se stavbou lebky u larev (do velikosti jedince 26 mm) (Daget et al., 1964). Mnou nalezený výběžek na hyomandibule daleko více odpovídá popisu a vyobrazení operkulárního výběžku (Allis, 1922), na jehož chrupavčitou plošku se vnitřní stranou připojuje operkulum. Tento operkulární výběžek mohl být v minulosti Budgettem mylně určen jako výztuha vnějších žaber (Budgett, 1901c) a další autoři tento popis převzali (Moy-Thomas, 1933).

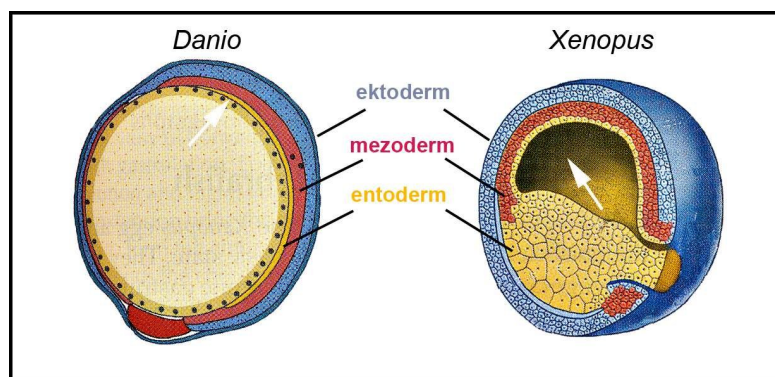


Obrázek 1: Larva druhu *Polypterus senegalus* velikosti 30 mm s vyobrazenou tyčinkou, údajně vyztužující vnější žábry. Převzato z Moy-Thomas, 1933.

Další skutečností odlišující vnější žábry bichira, která vyšla najevo během mé práce, je entoderm podílející se na jejich vzniku (viz kapitoly 5.1.2 a 5.1.3). Vnitřní epitel faryngu vysílá v hyoidní oblasti laterální výběžky na dvou místech. Anteriorněji vysílá entoderm výběžek směrem k vznikajícímu spirakulu,

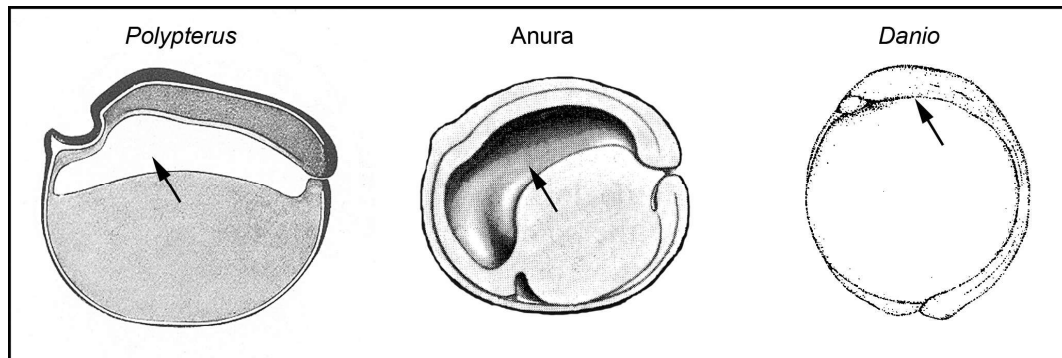
kteře se u bichirů zachovává stejně jako u paryb, jesetera a kostlína (Goodrich, 1958). Posteriořněji potom můžeme pozorovat laterální expanzi entodermu, který zasahuje až do nejdístařnější části primordia vnějších žaber. Zdá se, že tyto entodermální buňky nejen že přispívají k tvorbě vnějších žaber, ale že by dokonce mohly být vrstvou, která aktivně vytlačuje buňky laterálně, a má tak za následek samotný vznik externích „vyboulenin“, ze kterých se vnější žábry dále diferencují. Tento způsob vzniku vnější struktury bychom potom mohli nazvat endomorřickým, nebo-li procesem na jehož morfogenezi se podílí entodermální zárodečný list.

Důvodem proč entodermální epitel faryngu u bichira takto expanduje začne být zřejmější, podíváme-li se jak vypadá embryo ve stádiích předtím, než se začnou tvořit vnější žábry. Gastrulace totiž u bichira probíhá odlišně než u typických zástupců Actinopterygii a daleko více se podobá gastrulaci u obojživelníků a bahníků (Obr. 2, 3), tedy linie Sarcopterygii (Diedhiou & Bartsch, 2009; Kerr, 1907). Výsledkem je velmi prostorná dutina archenteronu, jejíž stěny jsou vystlány buňkami entodermu, nebo-li presumpřivním epitelem faryngu (Obr. 3). Takto vzniklá dutina se během pozdní neurulace a po ní následujících stádií dorzo-ventrálně stlačuje (Kerr, 1907; Diedhiou & Bartsch, 2009), pravděpodobně vlivem tlaku nově vzniklé neurální trubice, čímž dojde k zploštění dutiny prvostřeva a k vytlačení již vytvořených buněk entodermálního epitelu do stran (Obr. 4). Takto se dostává entoderm i do oblasti vzniku vnějších žaber a mohl by dokonce být tím impulsem prvotního vyboulení a zvýraznění jejich základů, po stranách hyoidní oblasti embrya.

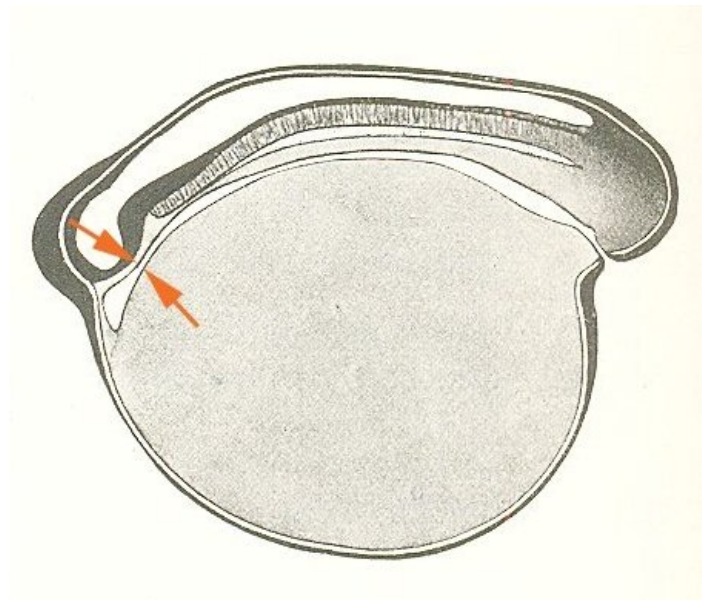


Obrázek 2: Srovnání gastrulace u drápatky (*Xenopus*) a zebřičky (*Danio*). Šipka označuje dutinu prvostřeva, vznikající při gastrulaci u obojživelníků a úplně chybějící u shodného vývojového stádia ryb . Podle Gilbert, 2010.

Pokud tento vývoj porovnáme s gastrulací a následnými stádii u modelového druhu pro ryby, zebřičky *Dania reria*, zjistíme, že takto prostorná dutina prvostřeva u něj vůbec nevzniká. Entoderm obalující žlutkovou kouli a entoderm tvořící strop budoucího faryngu je zde dokonce tvořen pouze jednou vrstvou. Tento prostor je na začátku extrémně stlačený a mezera zde vzniká až druhotně (Kimmel et al., 1995), při vzniku faryngu a úst.



Obrázek 3: Srovnání časné neuruly bichira (*Polypterus*), žab a zebřičky (*Danio*). Mód embryonálního vývoje bichira je velmi podobný tomu, co můžeme pozorovat u zástupců Sarcopterygní linie (žába). Šipka označuje dutinu prvostřeva. Podle Kerr, 1903; Balinsky, 1975 a Kimmel et al., 1995.



Obrázek 4: Post-neurulační vývoj u bichira (*Polypterus*). Původně vytvořená dutina prvostřeva se vlivem tlaku neurální trubice stlačuje. Zploštění naznačeno šipkami. Podle Kerr, 1903.

Poslední zvláštností vnějších žaber bichira je samotná jejich existence. Všechny paprskoploutvé ryby totiž mají pravé rybí žábry, které pro rozlišení můžeme nazývat vnitřními, a v celé této linii je tendence k jejich zdokonalování. Potřebují-li larvy těchto ryb nějaký přídatný respirační orgán, použijí k tomuto účelu strukturu, kterou už mají – modifikují filamenta vnitřních žaber (toto téma diskutuje kapitola 6.3). Dospělec bichira má stejně jako bahníci kromě žaber navíc jednoduché párové vzdušné vaky (Gegenbaur, 1878; Goodrich, 1958; Liem, 1988). Ty používá k dýchání spolu s vnitřními žábry, které jsou vyvinuté méně, než je tomu u jiných paprskoploutvých ryb. Místo obvyklých šesti žaberních oblouků, které nesou vnitřní žábry, má bichir pouze čtyři. Hyoidní oblouk nenese vnitřní žábry vůbec (Goodrich, 1958; Goodrich, 1909), a místo pěti branchiálních oblouků nalezneme u bichira pouze čtyři (Britz & Johnson, 2003). Navíc se anteriorní i posteriorní hemibranchium (dohromady kompletní žábra – holobranchium) nachází pouze na branchiálních obloucích I.-III.. Na IV. branchiálním oblouku se nachází pouze anteriorní hemibranchium (Goodrich, 1958). Právě to, že vnitřní žábry jsou hůře vyvinuté a plicní vaky, které v dospělosti pomáhají pokrýt respirační nároky, ještě nejsou vyvinuty vůbec, je pravděpodobně důvodem, proč si larva bichira vytvořila speciální respirační orgán v podobě vnějších žaber. Během sledování vývoje vnějších žaber na histologických řezech jsem navíc nepozorovala, že by se už v těchto stádiích objevovaly základy vnitřních žaber.

6.2 Vnější žábry Tetrapod

Uvnitř Sarcopterygní linie najdeme larvální stádia s vnějšími žábry u dvou skupin – bahníků (Dipnoi) a obojživelníků (Amphibia). Otázkou homologie vnějších žaber těchto dvou skupin se budu zabývat dále (kapitola 6.4) a pro hlubší analýzu jsem si z důvodu dostupnosti embryonálního materiálu vybrala zástupce z tetrapodní linie.

Největší skupinou s vnějšími žábry jsou obojživelníci, existence tohoto znaku byla dokázána i u jejich fosilních předků. Výsledky mé práce na vnějších žábách axolotla (*Ambystoma mexicanum*) se proto dobře hodí pro popis vývoje této struktury u skupiny, pro kterou jsou vnější žábry přímo charakteristické. Vnější žábry obojživelníků byly vždy zjednodušeně popisovány jako povrchové,

tedy epidermální výrůstky (Goodrich, 1958; Gegenbaur, 1878) a na jejich povrchu se také povrchový ektoderm opravdu nachází. Během raného vývoje jsem však nepozorovala, že by v základech vnějších žaber docházelo k nějakému ztluštění ektodermu (Schmalhausen, 1968), nebo že by se ektodermální list nějak významně podílel na zvětšování buněčné hmoty vnějších žaber. Při procesech spojených s utvářením žaberních oblouků dochází k uzavření mezodermálního zárodečného listu mezi vnější ektoderm a vnitřní entoderm, do takto vzniklého kanálu navíc proudí buňky neurální lišty (detailním studiem způsobu migrace hlavových buněk neurální lišty u axolotla se zabýval Černý et al., 2004). K růstu vnějších žaber situovaných na laterální straně žaberních oblouků poté dochází právě prodlužováním obloukového centra, kde se nachází buňky neurální lišty a mezodermu (viz kapitola 5.2.2, Tab. 7). Narozdíl od bichira, u axolotla faryngeální entoderm do vnějších žaber nezasahuje, je od nich oddělen vznikajícími chrupavčitými elementy branchiálních oblouků a mezi nimi vysílá výběžky ventrálním směrem, což koresponduje s ventrální pozicí prolamujících se žaberních štěrbin u ocasatých obojživelníků (Schmalhausen, 1968). Výslednou výplň vnějších žaber u axolotla tvoří mesenchymatické buňky produkující extracelulární matrix a díky práci mé kolegyně Kloučkové (Kloučková, 2011) se podařilo dokázat, že tyto buňky, vyplňující lumen vnějších žaber, jsou u axolotla původem z neurální lišty. Z mezodermu tak vznikají pouze svalová vlákna a pravděpodobně i cévy zajišťující krevní zásobení (viz kapitola 5.2.3).

U obojživelníků jsou vnější žábry asociovány s distálními elementy branchiálních oblouků I.-III. (Witzmann, 2004, Duellman a Trueb, 1986), jsou tedy připojeny na nejdorzálnější část hyobranchiálního aparátu, který je u obojživelníků ve srovnání s jejich rybími předky redukován. Většina autorů považuje tyto elementy za ceratobranchialia (Reilly & Lauder, 1988; Schmalhausen, 1968; Witzmann, 2004; Schoch & Witzmann, 2011) a chybějící, reduované elementy za epibranchialia a pharyngobranchialia (ancestrálně přítomné u čelistanců, de Beer, 1937). Existují ale i názory, že se redukovaly některé z proximálních částí branchiálního oblouku a distální element je epibranchialium (Deban & Wake, 2000; podle Carroll, 2007). Pokud však chceme tyto elementy považovat za homologní elementům nacházejícím se ve

stejně pozici u Actinopterygii, Dipnoi, *Latimerie* i vodních předků tetrapod, musí se jednat o ceratobranchialia (Reilly & Lauder, 1988).

K ceratobranchialiiím jsou vnější žábry u ocasatých obojživelníků připojeny pomocí dvou oddílů svalů, ventrálních *mm. depressores branchiarum* a dorzálních *mm. retractores branchiarum* (Schmalhausen, 1968). Edgeworth (Edgeworth, 1935) ve své práci nazývá dorzální oddíl svalů *mm. levatores branchiarum* a zajímavé je, že jednotlivé svaly nejsou na ceratobranchialia připojené tak, jak bychom očekávali. Levator I. je připojen na ceratobranchialium II. a levatory II. a III. se společně připojují na ceratobranchialium III. Mně se bohužel díky nedostatku vhodně vedených řezů nepodařilo u axolotla tuto skutečnost ověřit. I v případě, že by tomu tak bylo, je však příslušnost vnější žábry danému oblouku jasně určená branchiální arterií, která ji zásobuje krví (viz kapitola 2.1).

Otisk vnějších žaber se dochoval na mnoha fosiliích paleozoických tetrapod, a je tak zřejmé, že se objevily již před vznikem skupiny Lissamphibia. Již u těchto předků obojživelníků se mohla objevovat neotenie a v případě metamorfózy se místo rychlého procesu jednalo spíše o pozvolnou, méně dokonalou přeměnu (Boy & Sues, 2000). Proto je obtížné rozlišit larvální a metamorfující jedince od dospělců, navíc byl stejný druh v různé životní fázi často popisován různými jmény. Fosilie s vnějšími žabrami patří právě mezi drobné, málo osifikované, pravděpodobně larvální formy, které řadíme do dvou skupin – Temnospondyli a Seymouriamorpha. Z Temnospondylů byly tři páry vnějších žaber nalezeny například u *Sclerocephala*, *Micromelerpetona*, *Apateona* (Boy & Sues, 2000) a *Archegeosaura* (Witzmann, 2004). Druhá skupina tetrapod s vnějšími žabrami (také tři páry) jsou Discosauriscidae (*Utegenia*, *Ariekanerpeton*, *Discosauriscus*), patřící mezi Seymouriamorpha, kteří jsou sesterskou skupinou dnešních Amniot. Původ skupiny Lissamphibia je stále diskutován a názor, že předci dnešních obojživelníků pocházeli ze skupiny Temnospondyli (Bolt, 1969) je jen jedním z nich. Witzmann (Witzmann, 2004) proto předpokládá, že vnější žábry se vyskytovaly nejen u přímých předků dnešních obojživelníků, ale že byly plesiomorfním znakem pro celou korunovou skupinu tetrapod.

I přesto, že byly vnější žábry u obojživelníků vždy tak rozšířené, nemusely být vždy adaptivním znakem bezpodmínečně nutným pro přežití

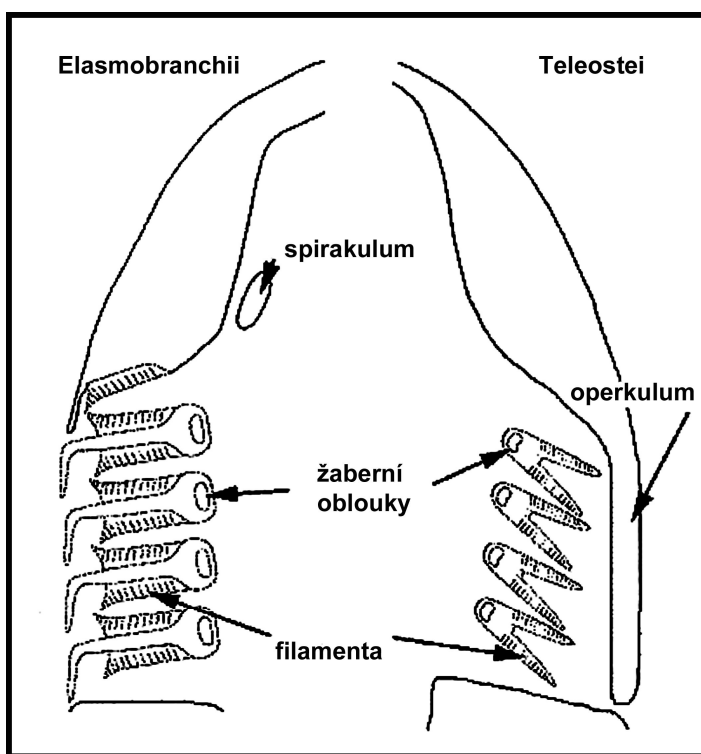
jedince. Některé studie prokázaly, že larvy ocasatých obojživelníků jsou za normálních podmínek schopné vykazovat stejnou spotřebu kyslíku i po odstranění vnějších žaber (Boell et al., 1963). Rozdíly v přežívání jedinců s žábami a bez nich se ukázaly až při extrémně nízkých koncentracích kyslíku, kde byli jedinci s žábami zvýhodněni. Kožní dýchání se ale jinak ukázalo jako dostačující. I normální neoteničtí jedinci s vnějšími žábami při běžném dýchání z velké části spoléhají na kožní dýchání (Guimond & Hutchison, 1976; podle Duellman & Trueb, 1986). U fosilních zástupců se dá kožní dýchání těžko potvrdit a z důvodu velkých tělesných rozměrů a šupinatého tělního pokryvu může být považováno za nepřilíš efektivní (Witzmann, 2007). Mezi výše zmíněnými tetrapody (Temnospondyli a Seymouriamorpha) ale najdeme i drobné zástupce (nebo larvy) a jedince s odlehčenými šupinami, tvořícími tělní pokryv podobný pokryvu u červorů, kteří naopak mohli dýchat skrz pokožku (Boy & Sues, 2000).

6.3 Vnější žaberní filamenta

Piskoř (*Misgurnus fossilis*) je jeden z druhů kostnatých ryb (Teleostei), u jejichž larev najdeme přídatné vnější respirační struktury. Teleostei jsou vrcholová, nejpokročilejší radiace ryb a jejich žábry („vnitřní“) dokonale slouží své funkci. Pokud jejich larvy potřebují přídatné dýchací orgány pro příjem kyslíku z vody, pomůžou si modifikací vývoje vnitřních žaber, které už mají. Takto vzniklá vnější žaberní filamenta najdeme kromě kostnatých ryb i u embryí paryb, u kterých jsou známější a byla v minulosti hojněji popisována (Goodrich, 1909; Goodrich 1958; Wyffels, 2009).

Filamenta se zakládají na vnější hraně vznikajících žaberních oblouků ještě před viditelným protržením žaberních štěrbin, což naznačuje, že jsou odvozena od vnějšího zárodečného listu (ektodermu). To potvrdily i histologické řezy, kde je patrné, že mezi vznikajícím filamentem a entodermální vrstvou nedochází ke kontaktu a i v místě protržení žaberní štěrbin jsou entodermální a ektodermální vrstva stále jasně odlišitelné (viz kapitola 5.3.2). Vývoj vnějších žaberních filament u piskoře proto můžeme považovat za epiblastický, nebo-li ektomorfický (odvozený z vnější zárodečné vrstvy, bez účasti vrstvy vnitřní). Ektodermální původ těchto filament zároveň znamená, že i vnitřní definitivní

žábry minimálně zčásti vznikají z ektodermu, protože z původně vnějších filament se (po překrytí operkulem) stanou filamenta vnitřních žaber, která pokračují ve vývoji a zvětšování komplexnosti celé struktury (viz Tab. 11). Ektodermální původ žaber u piskoře je v souladu s předpokládaným ektodermálním původem žaber čelistnatých obratlovců (Gaisler & Zima, 2007), nebo alespoň kostnatých ryb (Goodrich, 1958). Naproti tomu u paryb, někdy bývají vnější žaberní filamenta popisována jako entodermální (Assheton, 1907) a místo z laterální hrany branchiálního oblouku vybíhají skrze perforované žaberní štěrbiny (Ballard et al., 1993), s připojením na posteriorní stranu žaberního septa (Goodrich, 1958; Basten et al., 2011). Důvodem odlišného vývoje, může být odlišná stavba žaber samotných u paryb (Obr. 5.); prodloužené žaberní septum je u nich delší než samotná žaberní filamenta a jejich lamely (Gegenbaur, 1878; Goodrich, 1958; Wilson & Laurent, 2002).



Obrázek 5. Porovnání stavby žaber u žraloků (Elasmobranchii) a kostnatých ryb (Teleostei).

Převzato z Wilson & Laurent, 2002.

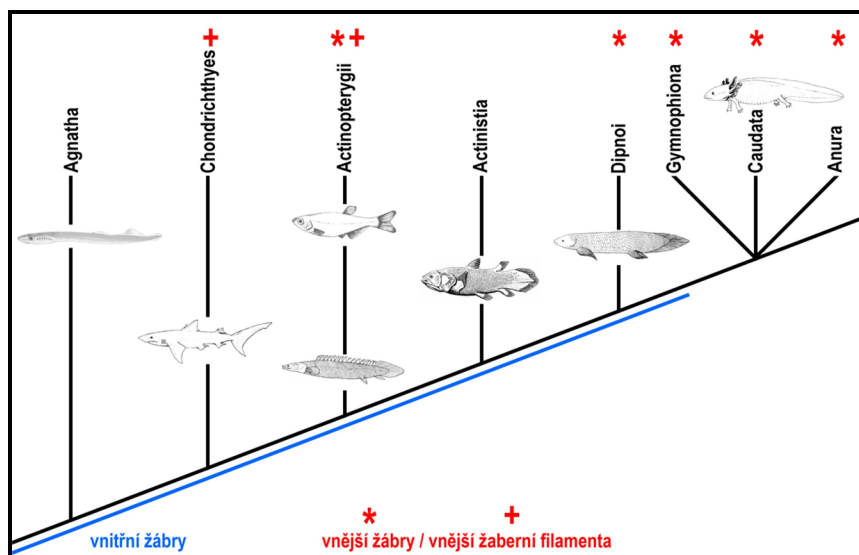
Pokud porovnáme pokročilost vývoje žaberních oblouků a samotného žaberního aparátu piskoře se stupněm vývoje žaber v době líhnutí u jiných druhů ryb, je na první pohled patrné, že branchiální aparát je u piskoře méně

vyvinut. U druhu *Oncorhynchus mykiss* můžeme v době líhnutí pozorovat diferencovaná žaberní septa s velkým počtem krátkých žaberních filament ve dvou řadách (anteriorní a posteriorní), ve kterých jsou již pozorovatelné krevní buňky (González et al., 1996). U druhu *Salmo salar* najdeme dokonce na žaberním septu 30-80 filament značné délky ve dvou řadách (Wells & Pinder, 1996). Pokud se ale podíváme na zástupce řádu Cypriniformes (kam patří i piskoř), má modelový druh *Danio rerio* žábry vyvinuté podstatně méně. V době líhnutí se filamenta teprve začínají tvořit, a to ve formě malých hrbolek na posteriorní straně žaberního oblouku (Kimmel et al., 1995). Podobný vývoj najdeme také u dalších zástupců řádu Cypriniformes z čeledi Cobitidae – *Cobitis takatsuensis* (Shimizu et al., 1998), *Misgurnus anguillicaudatus* (Fujimoto et al., 2006) a *Cobitis taenia* (Kryžanovskij, 1949). To vše naznačuje, že žábry u sekavcovitých ryb (možná i celého řádu Cypriniformes obecně) mají opožděný vývoj a v době líhnutí jsou méně vyvinuté než je obvyklé. Bylo nicméně dokázáno, že v období líhnutí závisí larvy ryb (i u druhů s vyvinutějšími žabrami) převážně na kožním dýchání (kupříkladu studie na druhu *Oncorhynchus tshawytscha*, Robmbough & Ure, 1991). Rychle se vyvíjející žábry potom přebírají větší a větší podíl na respiraci (Wells & Pinder, 1996). U sekavcovitých ryb se však larvy vyvíjejí v bentickém prostředí (Nelson, 2006) s horší dostupností kyslíku a pasivní příjem skrz pokožku pravděpodobně není dostačující. Zdá se tedy, že v reakci na hypoxické prostředí si tyto larvy z již předdefinovaného povrchového epitelu, topograficky předurčeného pro vznik žaber, urychleně vyvinou jednoduchá vnější filamenta. Žaberní filamenta, která se posléze integrují do komplexní struktury vnitřních žaber, tak ve vývoji předběhla vznik samotného žaberního septa, na kterém normálně žábry vznikají, a operkulárního záhybu, který je překrývá. Tento posun naznačuje, že vnější pozice žaberních filament je důsledkem heterochronie, která způsobí, že filamenta, která by normálně byla vnitřní, se vyvinou dříve a než dojde k dovývinu branchiální oblasti a vzniku žaberních sept překrytých operkulárním záhybem, plní svou funkci „vně“ a k jejich posunu dovnitř dojde až sekundárně.

6.4 Problematika homologie

Podíváme-li se na výskyt vnějších žaber a vnějších žaberních filament u recentních skupin (Obr. 6), hned nás napadne, zda jsou tyto struktury homologické, tedy zda existoval nějaký společný předek všech těchto skupin, který měl vnější žábry.

Mé výsledky potvrdily, že jednoduchá vnější žaberní filamenta jsou odlišnou strukturou, jak navrhoval již Goodrich, který je jako první odlišil (Goodrich, 1909). V podstatě se nejedná o řešení problému s nedostupností kyslíku pomocí nově vzniklé struktury, namísto toho je díky heterochronii umožněn předčasný vývoj a funkčnost oblasti primární výměny dýchacích plynů, stávající respirační struktury – jednotlivých filament vnitřních žaber. Otázkou však stále zůstává, zda jsou tato vnější filamenta homologická mezi Chondrichthyes a Actinopterygii. U mnou studovaného piskoře se jedná o strukturu odvozenou z ektodermu, který dá vznik vnitřním žábrám. Stavba žaber u paryb je však odlišná (Obr. 5.) a v minulosti byly spolu s žábami kopinatce a Cyclostomat označovány i jako entodermální (Gegenbaur, 1901). To, zda jsou vnější žaberní filamenta paryb a ryb homologická, tedy závisí na tom, zda můžeme vůbec za homologické považovat jejich žábry a to je stále jednou z velkých nezodpovězených otázek srovnávací zoologie a evoluční vývojové biologie.



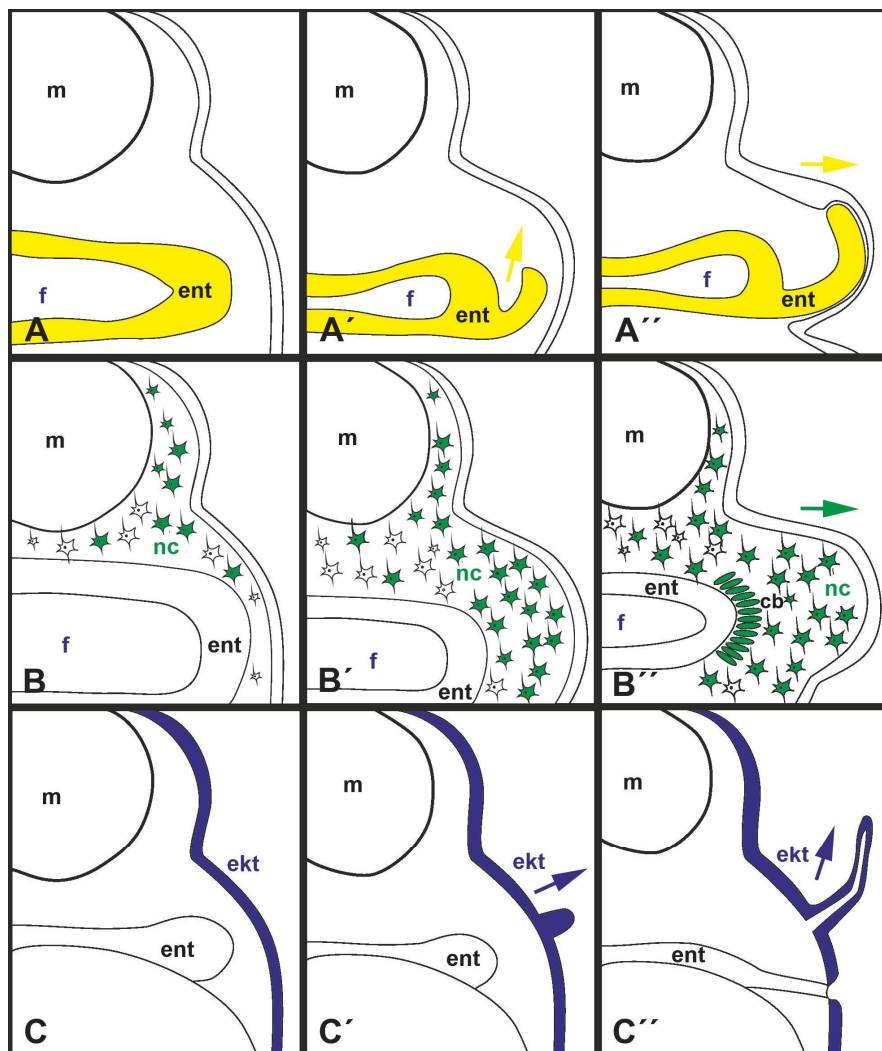
Obrázek 6. Výskyt vnějších respiračních struktur, na kladogramu ukazujícím hlavní vertebrátní linie. S použitím kreseb M. Král'oviče.

Mezi zástupci s pravými vnějšími žábry byl vždy stavěn stranou bichir. Z mých výsledků je však patrné, že výsledná stavba vnějších žaber bichira je obdobná jako u axolotla. Vyztužení pomocí speciální chrupavčité struktury, které bývalo jedním z hlavních důvodů odlišnosti vnějších žaber bichira (Witzmann, 2004), se neprokázalo. A důvod přítomnosti vnějších žaber na hyoidním oblouku se zdá být čistě praktický - vnější žábry na hyoidním oblouku dokážou být funkční dříve, než branchiální vnější žábry. Nemusí se tedy jednat o novou hyoidní strukturu, ale jen o posun přídatné respirační struktury směrem k co nejranější funkčnosti. V rámci linie Actinopterygii je ale bichir jediným zástupcem s vnějšími žábry, a proto se přítomnost vnějších žaber u společného předka Actinopterygii a Sarcopterygii zdá nepravděpodobná.

V rámci Sarcopterygii linie jsou dvě skupiny s vnějšími žábry – Dipnoi a Amphibia. Z důvodu nedostupnosti embryonálního materiálu nejsou po histologické stránce vnější žábry bahníků moc dobře prostudované, ze starších prací se však zdá, že jsou velmi podobné jako vnější žábry obojživelníků a bichira, jen místo třech párů jako u obojživelníků mají bahníci čtyři páry vnějších žaber (Kerr, 1900; Kerr, 1909; Budgett, 1901b). Ačkoliv však redukce počtu párů žaber jsou u obojživelníků poměrně časté (Duellman & Trueb, 1986), rudimentární čtvrtý pár se u nich nikdy nepodařilo najít (Witzmann, 2004; Schoch & Witzmann, 2011). Fosilní předci dnešních bahníků navíc obývali mořské prostředí, přičemž pravé vnější žábry byly dosud popsány pouze u sladkovodních druhů. Původní zástupci měli také velmi dobře vyvinuté vnitřní žábry (Campbell & Barwick, 1986; Bemis, 1986), tudíž byli daleko podobnější dnešnímu *Neoceratodovi*, který narozdíl od odvozenějších bahníků z čeledi Lepidosirenidae (Burggren & Johansen, 1986) vnější žábry nemá.

Pokud si tedy vymapujeme výskyt vnějších žaber na fylogenetickém stromě (Obr. 6.), najdeme tento znak přítomný ve třech samostatných liniích a navíc dvě linie, u kterých se vyskytují vnější žaberní filamenta. Z důvodů popsaných výše můžeme s velkou pravděpodobností vyloučit, že se v tomto případě jedná o klasickou homologii, ve smyslu exprese stejného fenotypu zděděného od společného předka všech těchto skupin (Wake et al., 2011). V dnešní době molekulárních přístupů se však ukazuje, že homologie má mnoho podob a velmi záleží na hloubce a hierarchickém stupni, na kterém dané struktury porováváme. Srovnáme-li si vedle sebe, jak se z morfogenetického

hlediska vyvíjí vnější respirační struktury u třech mnou studovaných druhů (*P. senegalus*, *A. mexicanum*, *M. fossilis*), najdeme tři naprosto odlišné módy vývoje. Odlišný vývoj není tak překvapivý u vnějších žaberních filament piskoře, vezmeme-li v úvahu, že se vlastně jedná o vnitřní žábry. Vnější žábry axolotla a bichira jsou si však ve výsledku velmi podobné, a proto jsou tak rozdílné cesty vedoucí ke „stejnému“ výsledku zajímavé. Jednou je totiž dominující vrstvou zodpovědnou za to, že embryu „narostou“ vnější žábry neurální lišta (axolotl), a podruhé se zdá, že tu samou roli přebírá během časně embryogeneze entoderm faryngu (bichir) (Obr. 7). Z tohoto úhlu pohledu, vzhledem k rozdílnostem ve vývoji, by se daly tyto tři respirační struktury považovat za analogické (struktury se stejnou funkcí jako jiné struktury u rozdílných živočichů), vzniklé konvergencí (*sensu* Owen, 1843; podle Wake, 2003).



Obrázek 7: Schematizovaný náčrt jednotlivých módů vývoje vnější respirační struktury u třech mnohou studovaných druhů. (A-A'') *Polypterus senegalus*, (B-B'') *Ambystoma mexicanum*, (C-C'') *Misgurnus fossilis*. Barevně vždy zvýrazněna zárodečná vrstva řídící morfogenezi vnější respirační struktury u daného druhu (žlutě – entoderm, zeleně – neurální lišta, modře – ektoderm). (A-A'') Entoderm se výrazně podílí na tvorbě vnějších žaber a spoluutváří respirační epitel. (B-B'') Entoderm neproniká do oblasti vnějších žaber a je od nich oddělen vznikajícím chrupavčím ceratobranchialiem (B''). Nevybarvené hvězdicovité buňky představují mezenchym původu jiného, než neurální lišty. (C-C'') Entoderm se nepodílí na tvorbě vnějších žaberních filament, i v místě žaberní štěrbin jsou hranice epitelů jasně oddělené (C'').

Podmínkou pro určení konvergentního vzniku u dvou podobných struktur je odhalení rozdílných genových kaskád, využití různých vývojových modulů nebo odlišný mechanismus vzniku. Konvergentně například došlo k prodloužení těla v několika liniích ocasatých obojživelníků, jednou zmnožením obratlů a u jiné skupiny prodloužením stávajících jednotlivých obratlů. K dosažení stejného výsledku tak obě skupiny došly s využitím jiného vývojového mechanismu, tudíž konvergentně (Wake, 2011). V případě vnějších žaber byly odhaleny odlišnosti v detailech rané morfogeneze, už Owen si ale uvědomoval, že vývoj je často předmětem druhově specifických modifikací (Owen 1848; podle Hall, 2012) a nikdy tedy nepodmiňoval homologii shodným vývojem.

Současné molekulární studie navíc odhalují, že struktury, které na základě klasických kritérií (morfologie, fylogenetika) nebyly považovány za homologické, využívají stejné genové kaskády či vývojové dráhy. V mnoha případech se totiž ukazuje, že vývojové moduly a genové regulační sítě, jak jednou vzniknou, mají tendenci přetrvat a v případě potřeby být znovu využity (Hall, 2012). Takovéto znovuvyužití genových regulačních sítí či modulů, v evoluci dávno vzniklých, bylo nedávno nazváno hlubinnou homologií (Shubin et al., 2009) a při bližším zkoumání se zjistilo, že se jedná o velmi častý jev.

Klasickým případem konvergentně vzniklých struktur byly vždy oči. Vysoce komplexní komorové oko obratlovců bylo považováno za odlišné a vzniklé nezávisle na složeném oku hmyzích zástupců. Tyto dvě skupiny (vertebrata, insecta) jistě neměly společného předka, který už měl vyvinuté oko jednoho konkrétního typu; rozhodně však měly společného předka, který nějaké oko měl a používal ho k vidění. Recentně vychází najevo, že tyto dva rozdílné typy očí sdílejí shodné transkripční faktory (*Pax 6*, *Eyless*), a že dokonce světločivné orgány všech živočichů využívají receptivní kaskádu založenou na

opsinu. Tento případ je považován za klasickou hlubinnou homologii a všechny dnešní způsoby světločivosti u bilaterií jsou tedy odvozeny od fotoreceptivní buňky společného předka, který využíval genovou kaskádu s transkripčním faktorem *Pax 6* vedoucí k produkci opsinu (Shubin, 2009). Touto problematikou se blíže zabývá několik článků (Kozmik, 2005; Vopalensky & Kozmik, 2009; Oakley, 2003).

Vrátíme-li se k vnějším žábřám, vzhledem k vzájemné podobnosti a identické funkci si i zde lze představit, že ve více vývojových liniích došlo k opětovnému využití stejného fyziologického modulu, spuštěného nedostatkem kyslíku. Potřeba přídatného dýchání by mohla paralelně u všech linií spustit stejnou starobylou kaskádu vedoucí k vytvoření vnější respirační struktury v předem definované branchiální oblasti; rozdíly v časné morfogenezi by pak byly způsobeny pouze rozdíly vycházejícími z fylogenetické vzdálenosti a odlišných podmínek daných embryologickým nastavením jednotlivých organismů. Data zabývající se expresí transkripčních faktorů ve vnějších žábřách zatím naprosto chybějí a z výše popsaných důvodů se ukazuje, že jsou pro pochopení problematiky vnějších žaber a posouzení jejich homologie, ať už na jakékoliv úrovni, naprosto klíčová. Odhalení takového případného hlubinně sdíleného fyziologického modulu, a také detailní popsání vývojových procesů, zodpovědných za vznik vnějších žaber je tedy směr, který by do této problematiky mohl vnést více světla, a kterým by se výzkum v této oblasti měl dále ubírat.

7 Závěr

V této práci byl důkladně prostudován vývoj vnějších žaber u dvou druhů, zastupujících odlišné vývojové linie. K popsání detailů vnější i vnitřní morfologie základního stavu vnějších žaber posloužil axolotl druhu *Ambystoma mexicanum* (Amphibia), tento základní mód vývoje byl srovnáván s detaily vývoje vnějších žaber u bichira druhu *Polypterus senegalus* (Actinopterygii). Pro pochopení a popsání rozdílů mezi vnějšími žábami a vnějšími žaberními filamenti byla důkladně studována morfogeneze vnějších žaberních filament u piskoře druhu *Misgurnus fossilis* (Cobitidae). Byla shromážděna data o celkovém vnějším vývoji a postupné stavbě, o dynamice morfogenetických pochodů zúčastněných zárodečných vrstev a detailní histologii respiračních struktur výše uvedených druhů.

Ukázalo se, že vnější žaberní filamenta jsou svou stavbou výrazně jednodušší respirační strukturou. Jejich vývoj je velmi rychlý a jedná se vlastně o pouhé vytažení kapilární smyčky potažené vnějším ektodermálním epitelem, tvořícím pokryv těla. Tato první filamenta vznikají na laterální hraně žaberních oblouků díky heterochronii dříve, než je vyvinutá samotná branchiální oblast. Tento netypický stav trvá pouze krátce a v dalším vývoji se filamenta integrují do branchiální oblasti a stanou se prvními filamenti vnitřních žaber, které dále rychle nabývají na komplexnosti. Hlavními rozdíly, které byly zjištěny u vnější žaberních filament a odlišují je od vnějších žaber, jsou absence vyztužení vnějších žaberních filament ve formě buněk produkujících extracelulární matrix, absence svalových vláken uvnitř filament a persistence těchto původně vnějších filament jako součást celoživotně přítomných vnitřních žaber.

Pro pravé vnější žábry byly popsány dva odlišné způsoby raného vývoje. U bichira přispívá tkáňově do vnějších žaber entodermální epitel faryngu, naproti tomu u axolotla nic takového nepozorujeme, entoderm zde zůstává striktně uzavřen uprostřed mezi chrupavkami vyztužujícími branchiální oblast, a do vnějších žaber se dostávají hlavně buňky neurální lišty, spolu s mezodermem svalových vláken. Zjištěné odlišnosti byly diskutovány vzhledem k odlišnému načasování vzniku vnějších žaber a k rozdílům v časné embryogenezi vycházejícím z fylogenetické vzdálenosti obou druhů. Přítomnost

chrupavčité výztuhy vnějších žaber u bichira, což býval hlavní důvod pro jejich odlišnost od vnějších žaber obojživelníků, se nepotvrdila. Shrnutí proximálních příčin hyoidní pozice vnějších žaber u bichira ukazuje mnoho důvodů, proč k tomuto posunu mohlo dojít a proč je tato pozice pro bichira výhodnější, než umístění na branchiálních obloucích, jako je tomu u obojživelníků a bahníků.

Data prezentovaná v této diplomové práci významně rozšířila naše vědomosti o vzniku a vývoji přídatných respiračních struktur a umožnila konečně srovnávat jednotlivé aspekty vývoje mezidruhově. Vzhledem k popsaným rozdílům, daným přizpůsobivostí a proměnlivostí vývoje, na kterém také pracuje evoluce, nejsou však tato zjištění dostatečná pro konečné posouzení vzájemné homologie vnějších respiračních struktur. Byly proto představeny různé koncepty homologie s cílem vyjevit, na který typ dat je důležité se v budoucí práci zaměřit. Jako nezbytné se ukazuje popsat genovou expresi ve vnějších žábách a odhalit klíčové transkripční faktory řídící vznik vnějších žaber. Zajímavá zjištění také může přinést zatím nepublikovaná práce zabývající se migrací buněk neurální lišty u bazálních Actinopterygii (J. Štundl), kde se ukazuje nezvykle početná populace buněk hyoidního proudu u bichira, což by mohlo znamenat, že i tady jsou vnější žábry tvořeny buňkami neurální lišty.

Unikátnost vnějších žaber jednotlivých druhů však stále zůstane zachována ve způsobu, jakým embryo vždy využije právě ty zárodečné vrstvy, které zrovna má k dispozici, i pokud se nakonec podaří ukázat, že ke vzniku vnějších žaber pokaždé dojde aktivací prastarého fyziologického modulu, který je spouštěn nedostatkem kyslíku.

8 Seznam použité literatury

- Allis EP.** 1922. The cranial anatomy of *Polypterus*, with special reference to *Polypterus bichir*. *Journal of Anatomy* 56:189-294.
- Assheton R.** 1907. The development of *Gymnarchus niloticus*. In: *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 T.Browne, J.Herbert Budgett and J.Graham Kerr* (ed. Kerr JG). pp. 293-432. Cambridge: Cambridge University Press.
- Balinsky BI.** 1975. *An introduction to embryology*, 4th Edition. W. B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto.
- Ballard WW, Mellinger J, Lechenault H.** 1993. A series of normal stages for development of *Scyliorhinus canicula*, the lesser spotted dogfish (Chondrichthyes: Scyliorhinidae). *Journal of Experimental Zoology* 267:318-336.
- Bartsch P, Gemballa S, Piotrowski T.** 1997. The embryonic and larval development of *Polypterus senegalus* Cuvier, 1829: its staging with reference to external and skeletal features, behaviour and locomotory habits. *Acta Zoologica* 78:309-328.
- Basten LB, Sherman RL, Lametschwandtner A, Spieler RE.** 2011. Development of embryonic gill vasculature in the yellow stingray, *Urobatis jamaicensis*. *The Anatomical Record* 294:1423-1432.
- Bemis WE.** 1986. Feeding system of living Dipnoi: Anatomy and function. *Journal of Morphology Supplement* 1:249-275. New York (Alan R. Liss, Inc.).
- Boell EJ, Greenfield P, Hille B.** 1963. The respiratory function of gills in the larvae of *Amblystoma punctatum*. *Developmental Biology* 7:420-431.
- Bolt JR.** 1969. Lissamphibian origins: possible protolissamphibian from the lower permian of Oklahoma. *Science* 166:888-891.
- Bond AN.** 1960. An analysis of the response of salamander gills to changes in the oxygen concentration of the medium. *Developmental Biology* 2:1-20.
- Bordzilovskaya NP, Dettlaf TA, Dumon ST, Malacinski GM.** 1989. Developmental-stage series of axolotl embryos. In: *Developmental biology of the Axolotl* (eds. Armstrong JB & Malacinski GM). pp. 201-219. Oxford University Press, New York & Oxford.
- Boy JA & Sues HD.** 2000. Branchiosaurus: larvae, metamorphosis and heterochrony in Temnospondyls and Seymouriamorphs. In: *Amphibian Biology*, volume 4: *Palaeontology* (eds. Heatwole H & Carroll RL). pp. 1150-1197. Surrey Beatty, Chipping Norton.
- Brauer A.** 1899. Beiträge zur kenntnis der entwicklungsgeschichte und der anatomie der Gymnophionen. II. Die entwicklung der äussern form. *Zool. Jahrb., Anat.* 12:477-508.
- Britz R & Johnson GD.** 2003. On the homology of the posteriormost gill arch in polypterids (Cladistia, Actinopterygii). *Zoological Journal of the Linnean Society* 138: 495-503.
- Bronner-Fraser M.** 1994. Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *The FASEB Journal* 8:699-706.
- Brunelli E, Perrotta E, Tripepi S.** 2004. Ultrastructure and development of the gills in *Rana dalmatina* (Amphibia, Anura). *Zoomorphology* 123:203-211.
- Budgett JS.** 1901. On some points in the anatomy of *Polypterus*. In: *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 T.Browne, J.Herbert Budgett and J.Graham Kerr* (ed. Kerr JG).

- pp. 100-117. Cambridge: Cambridge University Press.
- Budgett JS.** 1901b. 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: *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 T.Browne, J.Herbert Budgett and J.Graham Kerr* (ed. Kerr JG). pp. 119-139. Cambridge: Cambridge University Press.
- Budgett JS.** 1901c. On the structure of the larval *Polypterus*. In: *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 T.Browne, J.Herbert Budgett and J.Graham Kerr* (ed. Kerr JG). pp. 154-186. Cambridge: Cambridge University Press
- Burggren WW, Johansen K.** 1986. Circulation and respiration in Lungfishes (Dipnoi). *Journal of Morphology Supplement* 1:217-236. New York (Alan R. Liss, Inc.).
- Campbell KSW, Barwick RE.** 1986. Paleozoic lungfishes – A review. *Journal of Morphology Supplement* 1:93-131. New York (Alan R. Liss, Inc.).
- Cannatella D.** 1999. Architecture: Cranial and axial musculoskeleton. In: *Tadpoles: The biology of anuran larvae* (eds. McDiarmid RW & Altig R). pp. 52-91. The University of Chicago Press. Chicago and London.
- Carroll RL.** 2007. The palaeozoic ancestry of salamanders, frogs and caecilians. *Zoological Journal of the Linnean Society* 150:1-140.
- Černý R, Meulemans D, Berger J, Wilsch-Braüninger M, Kurth T, Bronner-Fraser M, Epperlein HH.** 2004. Combined intrinsic and extrinsic influences pattern cranial neural crest migration and pharyngeal arch morphogenesis in axolotl. *Developmental Biology* 266:252-269.
- Daget J, Bauchot ML, Bauchot R, Arnoult J.** 1964. Développement du chondrocrâne et des arcs aortiques chez *Polypterus senegalus* Cuvier. *Acta Zoologica* 45:201-244.
- Darnell RM.** 1949. The aortic arches and associated arteries of caudate amphibia. *Copeia* 1(1949):18-31.
- de Beer GR.** 1937. *The development of the vertebrate skull*. Oxford: Oxford University Press.
- de Saint-Aubain ML.** 1981. Shunts in the gill filament in tadpoles of *Rana temporaria* and *Bufo bufo* (Amphibia, Anura). *The Journal of Experimental Zoology* 217:143-145.
- de Saint-Aubain ML.** 1985. Blood flow patterns of the respiratory systems in larval and adult amphibians: Functional morphology and phylogenetic significance. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 23:229-240.
- Deban SM, Wake DB.** 2000. Aquatic feeding in salamanders. In: *Feeding: form, function, and evolution in tetrapod vertebrates* (eds. Schwenk K). pp. 65–94. San Diego: Academic Press.
- Del Pino EM & Escobar B.** 1981. Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that of other egg-brooding hylid frogs. *Journal of Morphology* 167:277-295.
- Didier DA, Leclair EE, Vanbuskirk DR.** 1998. Embryonic staging and external features of development of the chimaeroid fish, *Callorhinchus milii* (Holocephali, Callorhinchidae). *Journal of Morphology* 236:25-47.
- Didhiou S & Bartsch P.** 2009. Staging of the early development of *Polypterus* (Cladistia: Actinopterygii). In: *Development of non-teleost fishes* (eds. Kunz YW, Luer CA, Kapoor BG). pp. 105-169. Science Publishers: Enfield (NH).
- Duellman W & Trueb L.** 1986. *Amphibian biology*. New York: McGraw Hill.
- Dünker N, Wake MH, Olson WM.** 2000. Embryonic and larval development in the Caecilian *Ichthyopsis kohtaoensis* (Amphibia, Gymnophiona): A staging table. *Journal of Morphology* 243:3-34.

- Edgeworth FH.** 1935. *The cranial muscles of vertebrates*. Cambridge University Press London.
- Fujimoto T, Kataoka T, Sakao S, Saito T, Yamaha E, Arai K.** 2006. Developmental stages and germ cell lineage of the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Zoological Science* 23:977-989.
- Gaisler J & Zima J.** 2007. *Zoologie obratlovců*. Academia.
- Gardiner BG, Schaeffer B, Masserie JA.** 2005. A review of the lower actinopterygian phylogeny. *Zoological Journal of the Linnean Society* 144:511-525.
- Gegenbaur C.** 1878. *Elements of comparative anatomy*. Macmillan and Co. London.
- Gegenbaur C.** 1901. *Vergleichen Anatomie der Wirbeltiere*, volume 2. Engelmann, Leipzig.
- Gerhardt E.** 1932. Die Kiemenentwicklung bei anuren (*Pelobates fuscus*, *Hyla arborea*) und urodelen (*Triton vulgaris*). *Zoologische Jahrbuecher Sysematik* 55:173-220.
- Gilbert SF.** 2010. *Developmental biology*, 9th Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Gisbert E.** 1999. Early development and allometric growth patterns in Siberian sturgeon and their ecological significance. *Journal of Fish Biology* 54:852-862.
- González ME, Blázquez MJ, Rojo C.** 1996. Early gill development in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Morphology* 229:201-217.
- Goodrich ES.** 1909. Part IX. Vertebrata craniata In: *A Treatise on Zoology* (ed. Lankester R). London: Adam and Charles Black.
- Goodrich ES.** 1958. *Studies on the structure and development of vertebrates*. Vol. II. Chapters 9-14. Dover publications, Inc. New York and Constable and Company Ltd. London
- Gosner KL.** 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190.
- Guimond RW & Hutchison VH.** 1976. Gas exchange of the giant salamanders of North America. In: *Respiration of Amphibious Vertebrates* (ed. Hughes GM). pp. 318-338. New York (Academic Press).
- Hall BK.** 2000. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evolution & Development* 2:3-5.
- Hall BK.** 2012. Parallelism, deep homology, and evo-devo. *Evolution & Development* 14:29-33.
- Hamlett WC, Wourms JP, Smith JW.** 1985. Stingray placental analogues: structure of trophonemata in *Rhinoptera bonasus*. *Journal of Submicroscopic Cytology* 17(4):541-50.
- Hart M.** 2003. Larvae and larval evolution. In: *Keywords and concepts in evolutionary developmental biology* (eds. Hall BK & Olson WM). pp. 229-234. Harvard University Press Cambridge and London.
- Hermens M, Daffé M, Vandewalle P.** 2007. Observations of the reduction of external gill filaments during larval development in *Heterotis niloticus*. *Belgian Journal of Zoology* 137:247-249.
- Hraoui-Bloquet S & Exbrayat JM.** 1994. Development of gills in *Typhlonectes compressicaudus*, a viviparous gymnophionan amphibian. *Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et Biologie Animale* 15:33-46.
- Huxley TH.** 1861. Preliminary essay upon the systematic arrangement of fishes of the Devonian epoch. *Memoirs of the Geological Survey of India* 10:1-40.
- Inoue JG, Miya M, Tsukamoto K, Nishida M.** 2003. Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the „ancient fish“. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26:110-120.
- Kerr JG.** 1900. The external features in the development of *Lepidosiren paradoxa*, Fitz. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 192:299-330.
- Kerr JG.** 1903. The development of *Polypterus senegalus* Cuv. In: *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 T.Browne, J.Herbert Budgett and J.Graham Kerr* (ed. Kerr JG). pp. 195-289. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kerr JG.** 1909. Normal plates of the development of *Lepidosiren paradoxa* and *Protopterus annectens*. In: *Normentafeln zur entwicklungsgeschichte der wirbeltiere* (ed. Keibel F). pp. 1-31. Jena, Verlag von Gustav Fischer.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF.** 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203:253-310.
- Kloučková L.** 2011. Ontogentický vývoj chrupavčitých elementů lebky axolotla. Diplomová práce, Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.
- Kormanik GA.** 1993. Ionic and osmotic environment of developing Elasmobranch embryos. *Environmental Biology of Fishes* 38:233-240.
- Kostomarova, A.A.** 1991. The loach *Misgurnus fossilis*. In: *Animal species for developmental studies, Vol.2: Vertebrates* (eds. Dettlaff TA, Vassetzky SG). pp. 125-144. Consultants Bureau, New York: 1991.
- Kozmik Z.** 2005. Pax genes in eye development and evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* 15:430-438.
- Kral'ovič M.** 2009. Raná morfogénéza hlavových a dentálních tkanív bichira *P. senegalus*. Diplomová práce, Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.
- Kryvi H.** 1976. The structure of the embryonic external gill filaments of the velvet belly *Etmopterus spinax*. *Journal of Zoology* 180:253-261.
- Kryžanovskij SG.** 1949. Ekologo-morfologičeskije zakonomernosti razvitija kaprovych, vjunovych i somovych ryb (Cyprinoidei i Siluroidei). *Tr. Inst. Morf. Živ. AN SSSR* 1:5-332. Moskva.
- Lankester ER.** 1870. On the use of the term homology in modern zoology, and the distinction between homogenetic and homoplastic agreements. *Annals and Magazine of Natural History, Series 4*, 6:34-43.
- Laurent P, DeLaney RG, Fishman AP.** 1978. The vasculature of the gills in the aquatic and aestivating lungfish (*Protopterus aethiopicus*). *Journal of Morphology* 156:173-208.
- Lewinson D, Rosenberg M, Warburg MR.** 1987. Ultrastructural and ultracytochemical studies of the gill epithelium in the larvae of *Salamandra salamandra* (Amphibia, Urodela). *Zoomorphology* 107:17-25.
- Liem KF.** 1988. Form and function of lungs: the evolution of air breathing mechanisms. *American Zoologist* 28:739-759.
- Malvin GM.** 1983. Control of respiratory organ blood flow in a trimodal breather, *Ambystoma tigrinum*. Ph. D. dissertation. University of New Mexico.
- Moy-Thomas JA.** 1933. Notes on the development of the chondrocranium of *Polypterus Senegalus*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 76:209-229.
- Nelson JS.** 2006. *Fishes of the world*, 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Nokhbatolfoghahai M & Downie JR.** 2008. The external gills of anuran amphibians: Comparative morphology and ultrastructure. *Journal of Morphology* 269:1197-1213.
- Oakley TH.** 2003. The eye as a replicating and diverging, modular developmental unit. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18:623-627.
- Orton GL.** 1953. The systematics of vertebrate larvae. *Systematic Zoology* 2:63-75.
- Owen R.** 1843. *Lectures on comparative anatomy and physiology of the invertebrate animals, delivered at the Royal College of Surgeons in 1843*. Longmans, Brown, Green & Longmans, London.
- Owen R.** 1848. *On the archetype and homologies of the vertebrate skeleton*. Jon van Voorst, London.
- Patterson C.** 1982. Morphology and interrelationships of primitive actinopterygian fishes. *American Zoologist* 22:241-259.

- Pelster B & Bemis WE.** 1992. Structure and function of the external gill filaments of embryonic skates (*Raja erinacea*). *Respiration Physiology* 89:1-13.
- Pough FH, Janis CM, Heiser JB.** 2004. *Vertebrate life* (Seventh edition). Pearson Education International.
- Rauther M.** 1937. Pharynx und epitheliale organe der pharynxwand. In: *Handbuch der vergleichenden anatomie der wirbeltiere*. Volume 3. pp. 211-278. Berlin & Vienna (Urban & Schwarzenberg).
- Reilly SM, Lauder GV.** 1988. Atavisms and the homology of hyobranchial elements in lower vertebrates. *Journal of Morphology* 195: 237-245.
- Rodda KR & Seymour RS.** 2008. Functional morphology of embryonic development in the Port Jackson shark *Heterodontus portusjacksoni* (Meyer). *Journal of Fish Biology* 72:961-984.
- Rombough PJ & Ure D.** 1991. Partitioning of oxygen-uptake between cutaneous and branchial surfaces in larval and young juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Physiological Zoology* 64:717-727.
- Sarasin P & Sarasin F.** 1887-1890. Entwicklung über anatomie des *Ichthyophis*. *Ergebnisse Naturwiss. Forsch. Ceylon* 4:153-263.
- Scotland RW.** 2010 Deep homology: a view from systematics. *Bioessays* 32:438-449.
- Shimizu T, Sakai H, Mizuno N.** 1998. Embryonic and larval development of a Japanese spinous loach, *Cobitis takatsuensis*. *Ichthyological Research* 45 (4):377-384.
- Shook D & Keller R.** 2003. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mechanisms of Development* 120:1351-1383.
- Shubin N, Tabin C, Carroll S.** 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature* 457:639-648.
- Schlosser G & Roth G.** 1995. Distribution of cranial and rostral spinal nerves in tadpoles of the frog *Discoglossus pictus* (Discoglossidae). *Journal of Morphology* 226:189-212.
- Schmalhausen II.** 1968. *The origin of terrestrial vertebrates*. Academic Press. New York & London.
- Schoch RR & Witzmann F.** 2011. Bystrow's paradox – gills, fossils and the fish-to-tetrapod transition. *Acta Zoologica* 92:251-265.
- Thibaudeau G & Altig R.** 1999. Endotrophic anurans: Development and evolution. In: *Tadpoles: The biology of anuran larvae* (eds. McDiarmid RW & Altig R). pp. 170-188. The University of Chicago Press. Chicago and London.
- Uchiyama M & Yoshizawa H.** 1992. Salinity tolerance and structure of external and internal gills in tadpoles of the crab-eating frog, *Rana cancrivora*. *Cell and Tissue Research* 267:35-44.
- Valentine BD & Dennis DM.** 1964. A comparison of the gill-arch system and fins of three genera of larval salamanders, *Rhyacotriton*, *Gyrinophilus*, and *Ambystoma*. *Copeia* 1(1964):196-201.
- Viertel B & Richter S.** 1999. Anatomy: Viscera and endocrines. In: *Tadpoles: The biology of anuran larvae* (eds. McDiarmid RW & Altig R). pp. 92-148. The University of Chicago Press. Chicago and London.
- Viertel B.** 1991. The ontogeny of the filter apparatus of anuran larvae (Amphibia, Anura). *Zoomorphology* 110:239-266.
- Vopalensky P & Kozmik Z.** 2009. Eye evolution: common use and independent recruitment of genetic components. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 364:2819-2832.
- Wake DB, Wake MH, Specht CD.** 2011. Homoplasy: from detecting pattern to determining process and mechanism of evolution. *Science* 331:1032-1035.
- Wake DB.** 2003. Homology and homoplasy. In: *Keywords and concepts in evolutionary developmental biology* (eds. Hall BK & Olson WM). pp. 191-201. Harvard University Press Cambridge and London.
- Wake MH.** 1969. Gill ontogeny of embryos of *Gymnophis* (Amphibia: Gymnophiona). *Copeia* 1(1969):183-184.
- Wells PR & Pinder AW.** 1996. The respiratory development of atlantic salmon I. Morphometry of gills, yolk sac and body

- surface. *The Journal of Experimental Biology* 199:2725-2736.
- Wilkinson M & Nussbaum RA.** 1997. Comparative morphology and evolution of the lungless caecilian *Atretochoana eiselti* (Taylor) (Amphibia: Gymnophiona: Typhlonectidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 62:39-109.
- Wilson JM & Laurent P.** 2002. Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology* 293:192-213.
- Witzmann F.** 2004. The external gills of Palaeozoic amphibians. *Neues Jahrbuch Fur Geologie Und Palaontologie-Abhandlungen* 232:375-401.
- Witzmann F.** 2007. The evolution of the scalation pattern in temnospondyl amphibians. *Zoological Journal of the Linnean Society* 150:815-834.
- Wyffels JT.** 2009. Embryonic development of chondrichthyan fishes-a review. In: *Development of non-teleost fishes* (eds. Kunz YW, Luer CA, Kapoor BG). pp. 1-103. Science Publishers: Enfield (NH).

9 Příloha 1

9.1 Abstract of the talk for the meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology, 2012 in Lisbon



External gills of vertebrate larvae are generated by dissimilar developmental processes: implications for homology

Barbora Crkvova, Lenka Klouckova and Robert Cerny¹

¹Department of Zoology, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

External gills can be found in many vertebrates including lungfishes, amphibians and bichirs. Together with outer gill filaments (present in larval chondrichthyans and some actinopterygians) they represent key larval adaptations of vertebrate embryos and larvae. They usually form very early, before gill slits are pierced, and they are generally considered same structures that develop as ectodermal outgrowths on the head surface.

In a search for a common underlying mechanism responsible for formation of external gill structures, their developmental morphogenesis was studied in the Mexican axolotl (*A. mexicanum*), Senegal bichir (*P. senegalus*) and weather loach (*Misgurnus fossilis*). External gill filaments of weather loach represent simple prolongations of the outer ectoderm lining that form numerous filamentous structures. The Mexican axolotl develops three pairs of voluminous external gills on branchial area. Here, the epithelial surface is generated by the outer ectoderm while mesoderm and neural crest cells provide muscles and abundant supporting mesenchyme, respectively. The Senegal bichir develops instead only one pair of external gills on the hyoid arch. These structures develop very early, after neurulation and are primarily formed by endoderm pouching that brings this inner epithelial lining out of the head so that majority of outer gill epithelium is of endoderm origin. External gills in vertebrates can therefore be formed by dissimilar developmental processes; the main formative constrain of the bichir development is the mode of gastrulation, as will be discussed.