



Izolace a zmrazování spermatogonií a oogonií jeseterů pro účely uchování genetických zdrojů

M. Pšenička, T. Saito, M. Rodina, Z. Linhartová, M. Flajšhans



FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Izolace a zmrazování spermatogonií a oogonií jeseterů pro účely uchování genetických zdrojů

M. Pšenička, T. Saito, M. Rodina, Z. Linhartová, M. Flajšhans

Vodňany

2012

**VYDÁNÍ METODIKY JE USKUTEČNĚNO ZA FINANČNÍ PODPORY PROJEKTU:
OP RYBÁŘSTVÍ PŘÍPRAVA A VYDÁNÍ METODICKÝCH PUBLIKACÍ V ROCE 2012
(CZ.1.25/3.1.00/11.00381)**



**EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“**

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení projektů:

***Výzkum zmrazování spermií a embryí ryb (25%)
(QH82119)***

Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu, zemědělství a lesní hospodářství, podprogram B.1.16. Ryby (uchování a využití genetických zdrojů ryb v ČR; 1996–2012) (25%)

***Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz – CENAKVA (25%)
(CZ.1.05/2.1.00/01.0024)***

***Reprodukce a genetika vybraných modelových druhů kostnatých a chrupavčitých ryb (25%)
(GA JU 046/2010/Z)***



č. 129

ISBN 978-80-87437-68-1

1. CÍL METODIKY	6
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	6
2.1. Úvod	6
2.2. Odběr testes nebo ovarii	9
2.3. Enzymatická disociace testikulárních nebo ovariálních buněk	10
2.4. Separace spermatogonií/oogonií	10
2.5. Zmrazování spermatogonií/oogonií	14
2.6. Rozmrazení spermatogonií/oogonií	15
2.7. Možnosti obnovy genetického zdroje ze spermatogonií/oogonií	15
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	18
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	18
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	18
6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	19
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	21

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je popsat izolaci, kryoprezervaci a případné použití kmenových spermatogoniálních a oogoniálních zárodečných buněk jeseterů pro potřeby Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Spermatogie nebo oogonie jsou nejprve odebrány biopsií a poté enzymaticky disociovány, separovány koncentračním gradientem Percollu® a za specifických podmínek zmrazovány. Rozmražené buňky mohou být transplantovány buď do stejného anebo jiného běžnějšího druhu jesetera (např. jeseter malý, *Acipenser ruthenus*), prostřednictvím kterého produkují gamety donora. Několik miligramů odebraných juvenilních gonád tak může představovat velice efektivní genovou rezervu a navíc, při vhodném výběru recipienta, teoreticky zkrátit generační interval později dospívajících druhů.

2.1. Úvod

Rozhodnutím ministra zemědělství byl dne 20. září 2003 vyhlášen Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu, zemědělství a lesní hospodářství, do kterého spadají také jeseteři jeseter malý a vyza velká (*Huso huso*) jako autochtonní druhy. Národní program je ustanoven podle § 14 zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon) a podle prováděcí vyhlášky č. 447/2006 Sb. k tomuto zákonu.

Genetický živočišný zdroj je definován v §2 odst. 2 zák. č. 344/2006 Sb. (úplném znění novelizovaného plemenářského zákona č. 154/2000 Sb.) jako „jedinec, sperma, vajíčko, embryo, popřípadě ostatní genetický materiál autochtonního nebo lokálně adaptovaného druhu, plemene nebo populace zvířete, nacházející se na území České republiky, mající význam pro výživu a zemědělství, pro uchování biologické a genetické rozmanitosti světového přírodního bohatství a pro umožnění jeho využívání pro potřeby současných i budoucích generací, zařazené do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat významných pro výživu a zemědělství“.

Genetický živočišný zdroj může být uchován buď *in situ* anebo *ex situ* jako např. kryokonzervací (zamrazováním) spermatu, embryí, buněk nebo tkání *in vitro*. U ryb v ČR v současné době existuje kryobanka spermatu genetických zdrojů na FROV JU, VÚRH ve Vodňanech (Flajšhans a kol., 2009).

V současné době není zamrazování vajíček a embryí ryb možné kvůli vysokému obsahu žloutku a nízké permeabilitě membrány. Ačkoliv může být druh, linie či populace obnovena ze zamrazených spermií s použitím indukované androgenese s geneticky inaktivovanými jikrami podobného druhu, úspěšnost androgenese je extrémně nízká a výslední jedinci jsou homozygoti s určitou ztrátou maternální mtDNA. To vše tuto metodu obnovy genetických zdrojů komplikuje. Alternativou může být právě kryokonzervace kmenových zárodečných buněk, kterými jsou primordiální gonocyty (PGC), později spermatogonie nebo oogonie typu A (SaO). Ty se mohou po úspěšné transplantaci proliferovat v těle stejného (alogenní transplantace) nebo podobného druhu (xenogenní transplantace) a zajistit tak vznik jedinců odpovídajících jedinci, kterému byly tyto buňky odebrány ke kryokonzervaci a následné transplantaci.

SaO jsou obecně pluripotentní nediferenciované kmenové zárodečné buňky, zajišťující produkci gamet, přičemž jedinec se již diferenciovat začal. U juvenilních jeseterů je množství SaO enormní. Jejich prekurzory jsou embryonální PGC, kterých je v jednom embryu jen pár desítek a které je navíc nutné v případě izolace značit injikací fluorescenční sondy do embrya v raném stadiu vývoje. Navíc mají tyto buňky ještě schopnost migrace, přičemž SaO mají již tuto schopnost značně omezenou. PGC se tedy mohou transplantovat již do blastuly v oblasti prekurzorů PGC a ty, díky svému migračnímu potenciálu, putují do genitální rýhy. Pro obnovu gametogeneze pomocí PGC postačuje pouze jediná buňka (Saito a kol., 2008), ovšem embrya jeseterů ve fázi blastuly jsou pro tuto manipulaci velmi citlivá. Na druhou stranu SaO jsou injikovány přímo do genitální rýhy embrya nebo gonád. Oba typy zárodečných buněk jsou schopny po transplantaci do těla jedince kolonizovat zárodečnou rýhu či gonády a díky své plasticitě obnovit vznik obou typů pohlavních buněk v závislosti na pohlaví recipienta (de Rooij a kol., 1999; Ogawa a kol., 2000; Ohta a kol., 2000; Okutsu a kol., 2006; Saito a kol., 2010). Z výše zmíněného lze pak odvodit evidentní výhody a nevýhody použití PGC oproti SaO a fakt, že použití PGC je vzhledem k omezenému množství a citlivosti embryí pro tyto účely nepraktické.

Brinster a kol. (1994) poprvé představil techniku regenerace spermatogeneze u myši, když transplantoval spermatogoniální buňky donora do varlat infertilního recipienta. Spermatogonie se po transplantaci vyvíjely ve funkční spermie.

Okutsu a kol. (2006) jako první transplantoval spermatogonie u ryb. Pro vizualizaci transplantovaných buněk byl vytvořen transgenní pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), nesoucí v buňkách gen pro GFP (*green fluorescent protein*) řízený *cis*-elementem *vasa* genu, přičemž *vasa* gen je specificky exprimován v zárodečných buňkách (PGC, SaO). Izolované buňky byly enzymaticky disociovány a suspenze spermatogoniálních buněk byla injikována do peritoneální dutiny divoké formy pstruha ve stadiu líhnutí.

Po 20 dnech se transplantované buňky začaly proliferovat a diferenciovat v gonádách recipienta. Rok po transplantaci byly spermie recipientů použity pro oplození jiker divoké formy pstruha. F1 generace produkovala GFP pozitivní spermie odvozené od donora, které byly následně použity pro založení F2 generace. V případě, že byly spermatogonie transplantovány do těla samice, začaly se 49 dní po transplantaci v jejich gonádách diferenciovat GFP pozitivní oocyty, což dokazuje pohlavní plasticitu těchto buněk. Jikry pocházející ze spermatogonií vykazovaly normální plodnost a vývoj F1 i následné F2 generace. Z toho plyne, že diferenciace spermatogonií není autonomní záležitostí buněk, ale je ovlivňována zejména tělním prostředím.

Další vnitrodruhové transplantace spermatogonií byly provedeny např. u tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) vpravením fluorescenčně značených spermatogonií urogenitálním kanálkem přímo do testes samce, kde byla endogenní tvorba spermií potlačena pomocí busulfanu (DNA alkylační činidlo) a vysokou teplotou (Lacerda a kol., 2008); u smuhovité ryby druhu *Nibeia mitsukurii* mikroinjikací spermatogonií do zárodečné lišty sexuálně nediferencovaných alogenních larev (Takeuchi a kol., 2009); u juvenilní zebřičky pruhované (*Danio rerio*) (Kawasaki a kol., 2010); u dospělých samců a samic zebřičky pruhované s normálním vývojem ve spermie a vajíčka (Nobrega a kol., 2010); a u kranase japonského (*Seriola quinqueradiata*) (Morita a kol., 2012).

Po zdařilých alogenních transplantacích následovaly pokusy o xenogenní transplantace. Dárce spermatogonií byl pstruh duhový hemizygotní pro *vasa*-GFP gen a heterozygotní pro oranžovou dominantní mutaci. Příjemcem byla divoká forma masu lososa (*Oncorhynchus masou*). Oba druhy náleží do rodu *Oncorhynchus*. Ovšem hybridy vzniklé jejich křížením jsou neživotní. Dva roky po transplantaci křížili recipientní samce a samice lososa s divokou formou pstruha duhového. Z 33 samců lososa 16 tvořilo potomstvo odvozené ze spermatogonií pstruha (donora), mělo tedy GFP pozitivní PGC a oranžový pigment. Na druhou stranu z celkového počtu 38 recipientních samic produkovala F1 generaci odvozenou z transplantovaných buněk pouze jedna samice. Potomci ostatních samic byli neživotní hybridy (Okutsu a kol., 2008). Lacerda a kol. (2008) provedli xenogenní transplantaci spermatogonií cichlidy (*Cichla monoculus*) přes pohlavní papulu do semenotvorného kanálku adultních samců tilapie po ošetření busulfanem. Majhi a kol. (2009) pak transplantoval spermatogonie juvenilního gavúnovce argentinského (*Odontesthes bonariensis*) do testes adultního gavúnovce patagonského (*Odontesthes hatcheri*).

Podobným způsobem popsal Wong a kol. (2011) izolaci a transplantaci oogonií u zebřičky pruhované. Tyto buňky vykazovaly podobně jako spermatogonie v předchozích studiích svoji plasticitu a schopnost vytvářet obojí typ gamet.

2.2. Odběr testes nebo ovaríí

Prvním krokem izolace SaO je odběr testes nebo ovaríí. Lze říci, že izolace spermatogonií z testes je oproti izolaci oogonií snazší kvůli většímu podílu tuku v ovaríích. Ovšem určení pohlaví juvenilních jeseterů je komplikované a může zde dojít k záměně. V tomto případě lze stejným způsobem, jak je popsáno v této metodice, izolovat a pracovat jak se spermatogoniemi tak i s oogoniemi. Zásadním faktorem je zde stadium vývoje jedince. Vzhledem k tomu, že je vývoj poikilotermních organismů, jako jsou ryby, zásadně ovlivněn teplotou, není možné přesně stanovit vhodnou dobu odběru. Obecně lze říci, že se musí jednat o juvenilní jedince. Pokud jsou ve vzorku po mikroskopickém vyšetření nalezeny spermie nebo oocyty vyšších stadií, je tento vzorek pro odběr SaO nevhodný. Orientačně můžeme vhodný věk pro odběr stanovit na 3 roky u jesetera malého, 4–6 let u středně dlouho dospívajících druhů jako jeseter sibiřský (*Acipenser baerii*) nebo ruský (*Acipenser gueldenstaedti*) a 8–14 let u pozdně dospívajících druhů jako je vyza velká při průměrné roční teplotě 10 °C.

Pro hromadnou izolaci spermatogonií lze použít celé gonády ihned po uhytnutí nebo usmrcení jedince, ovšem pro účely uchování genetického zdroje je dostačující několik miligramů části gonády odebrané biopsií jak popisuje metodika Gela a kol. (2008) nebo operativně. Obr. 1 ukazuje testes jesetera sibiřského ve stadiu vhodném pro izolaci spermatogonií.



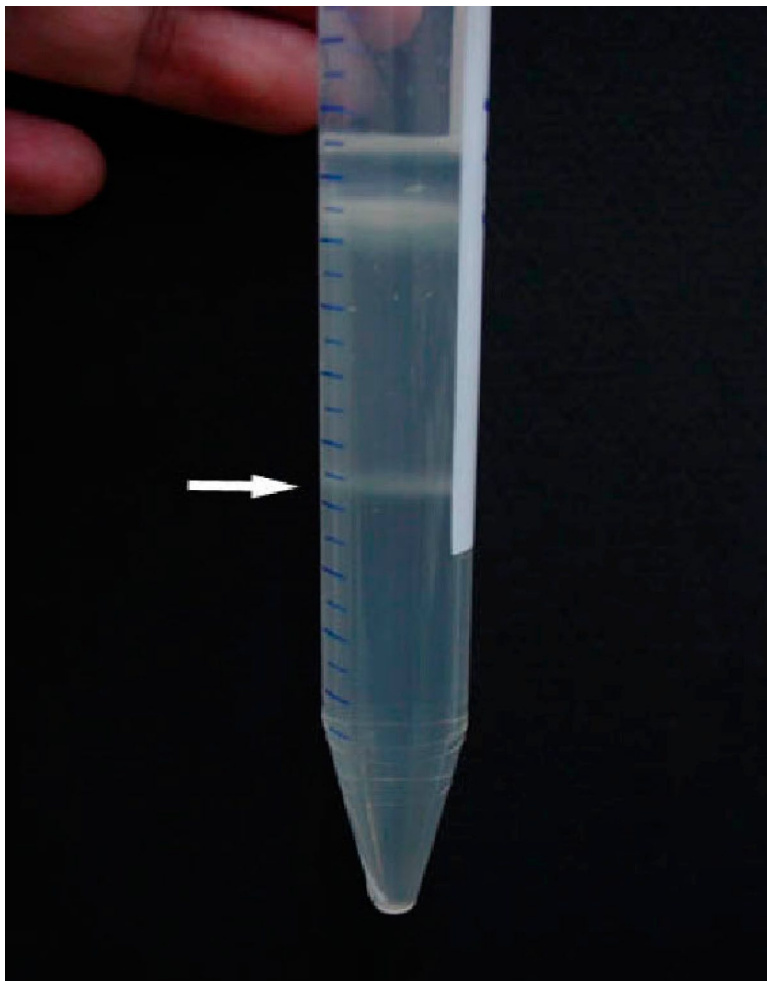
Obr. 1. Testes 4letého jesetera sibiřského. (foto M. Pšenička)

2.3. Enzymatická disociace testikulárních nebo ovariálních buněk

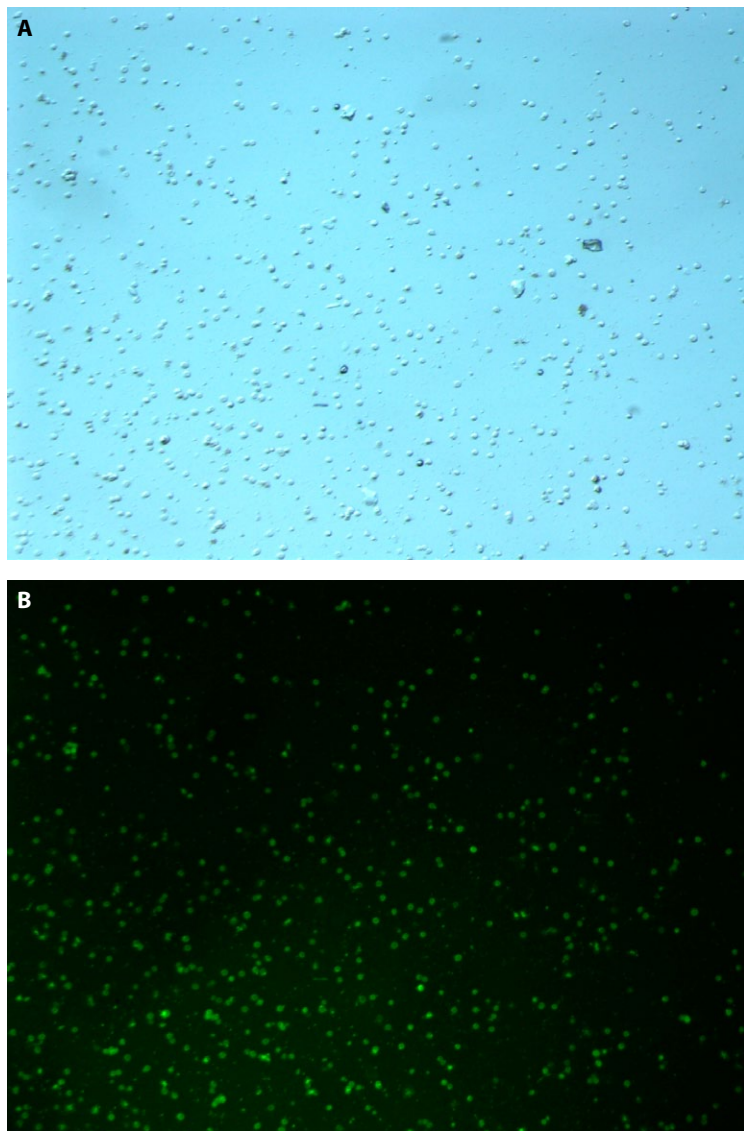
Po odebrání gonády je potřeba pracovat rychle. Celá procedura izolace a zmrazování trvá 10–12 hodin. Nejprve je nutné odseparovat tukovou tkáň. Dále se pracuje jen s očištěnými a omytými částmi gonád. Omytí se provádí v roztoku fosfátového pufru (PBS). Pro přípravu PBS se k 900 ml destilované vody přidá 8 g NaCl, 1,2 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 , 0,2 g KCl, pH se upraví roztokem NaOH na hodnotu 7,4 a pak se roztok doplní na výsledný objem 1 litru destilovanou vodou. Pro přípravu PBS lze případně použít komerčně dostupné tablety. Vzorek se po omytí nechá odkapat a zváží se na Petriho misce. Poté gonádu rozstříháme na velmi malé kousky (důkladné rozstříhání je důležité). Takto zhomogenizovanou část gonády přemístíme do směsi enzymů obsahující 0,3% trypsin, 0,1% kolagenázu a 0,1% hyaluronidázu rozpuštěnou v PBS. Na 1 g gonády náleží 100 ml směsi enzymů. Suspenze se nechá inkubovat po dobu 3 hodin za mírného míchání nebo obracení při pokojové teplotě. Suspenze buněk je dále filtrována přes 50 μm filtr (např. Partec, Německo).

2.4. Separace spermatogonií/oogonií

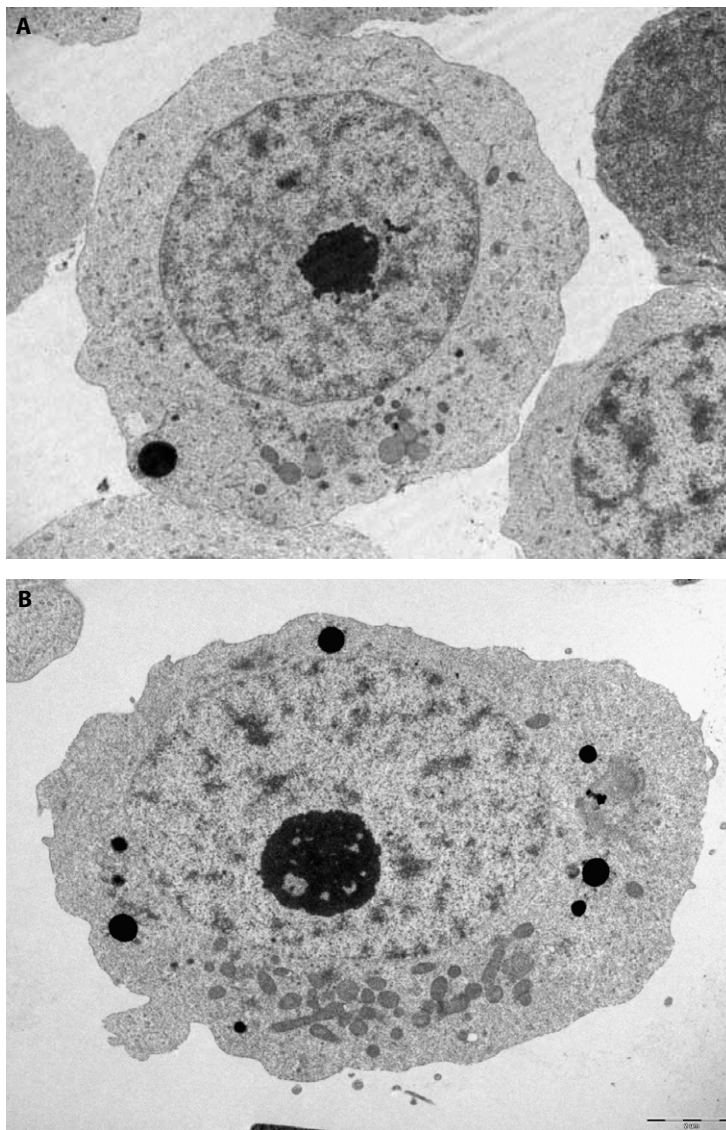
SaO jsou ze suspenze testikulárních a oogoniálních buněk separovány koncentračním gradientem Percollu®. Pro separaci se používají 15ml případně 50ml zkumavky vhodné pro centrifugaci. Dále se připraví roztoky Percollu® ve dvou koncentracích, první roztok o koncentraci Percollu® 33% a druhý 10% v PBS. Do zkumavky se odměří 30% jejího objemu prvního roztoku, na který se velice pomalu, po stěně zkumavky, pomocí injekční stříkačky, přidá 30% objemu zkumavky druhého roztoku. Na tyto dvě směsi Percollu® se stejným způsobem přidá 20% objemu zkumavky přefiltrované suspenze buněk. Se zkumavkou se pracuje velice opatrně, aby se jednotlivé gradienty nemieschaly. Zkumavky se vloží do centrifugy s výkyvným rotorem a centrifugují se 30 min při 500 g s minimální akcelerací a bržděním, aby se vrstvy nepromíchaly. Po centrifugaci se SaO nachází mezi prvním a druhým roztokem Percollu® (obr. 2), který se pipetou odsaje do čisté zkumavky (maximálně do 30% jejího objemu). Tato zkumavka se poté doplní PBS, její obsah se promíchá a opětovně se centrifuguje za stejných podmínek (omezení akcelerace a brždění již není nutné). Po tomto kroku se vytvoří peleta se SaO. Tato peleta se resuspenduje v PBS na konečnou koncentraci cca 10 milionů buněk v 1 ml. Pro zjištění koncentrace je možné použít např. Bürkerovu počítací komůrku. Detailní metodika použití je popsána v metodice Linhart a kol. (2011). Důkaz přítomnosti spermatogonií izolovaných popsáním způsobem přináší obrázek 3a,b (barvení pomocí antigenu pro spermatogonie) a 4a,b (snímky SaO z elektronové mikroskopie). Pro další práci s SaO je vhodné zjistit životnost buněk pomocí kitu LIVE/DEAD® Cell Viability (použití kitu v příbalovém letáku, případně lze postupovat podle článku Flajšhans a kol. (2004).



Obr. 2. Vrstva izolovaných spermatogonií jesetera sibiřského po centrifugaci v gradientu Percollu®. (foto M. Pšenička)



Obr. 3. Suspenze spermatogonií jesetera sibiřského značených antispermatogonia-specifickým antigenem 1, původně vyrobeným pro spermatogonie úhoře japonského (*Anguilla japonica*) (Kobayashi a kol., 1998), kombinovaným se sekundární protilátkou Anti-Rabbit IgG-FITC ze světelné (napravo) a fluorescenční mikroskopie (nalevo). Buňky z jiných gradientů Percollu® pak nevykazovaly afinitu k protilátce. (foto M. Pšenička)



Obr. 4. *Spermatogonie (nahore) a oogonie (dole) izolované z jesetera sibiřského fotografované pomocí transmisního elektronového mikroskopu. (foto M. Pšenička)*

2.5. Zmrazování spermatogonií/oogonií

Tato metoda spočívá v uchování živých buněk při velmi nízkých teplotách dosahovaných pomocí tekutého dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) při použití ochranných látek tzv. kryoprotektantů, jimiž jsou např. glycerol, dimethylsulfoxid (DMSO), metanol, propandiol, etylenglykol, atd. Kryoprotektant spolu s ředícím roztokem (někdy nazývaným extender) tvoří kryoprotektivní médium (kryoroztok), kterým se ředí suspenze buněk před zmražením.

Dalším kritickým bodem při zmrazování je vedle výběru kryoprotektivního média rychlost zmrazování. Nejpoužívanější technikou je pomalé zmrazování v řádu stupňů za minutu, při kterém jsou krystalky ledu formovány v extracelulárním roztoku i uvnitř buňky. Při dosažení teploty pod $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ je možné buňky přemístit do kapalného dusíku (Rodina a kol., 2010).

Získaná suspenze SaO se smíchá s kryoroztokem a nadávkuje po 500 μl do předem označených kryotub (nejlépe kryotuby s vnějším závitem, Nunc, Dánsko). Z našich experimentů se jako nejlepší varianta ukázalo mražení buněk v prostředí o složení: 0,5 % bovinního sérového albuminu (BSA), 50 mM glukózy a 1,5 M etylenglykolu rozpuštěné v PBS (finální koncentrace). Toho dosáhneme naředěním suspenze SaO v poměru 1+3 (1 objemový díl suspenze buněk v PBS + 3 objemové díly kryoroztku) s kryoroztkem, který se připraví rozpuštěním 6,67 g BSA, 12 g glukózy a 111,43 ml etylenglykolu do 1 l PBS (0,67% BSA, 66,6 mM glukóza, 2 M etylenglykol). Ředění suspenze buněk se provádí zvolna přikapáváním kryoroztku do suspenze buněk, abychom předešli prudké změně osmolality prostředí, tzv. osmotickému šoku. Uzavřené kryotuby temperujeme na ledu po dobu 10 minut a poté je vkládáme do komory zmrazovacího automatu (např. PLANER Kryo 10 series III, UK) (obr. 5) vychlazené na $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následuje ochlazování dávek rychlostí $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 90 min. Při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jsou kryotuby se SaO ihned přemístěny do tekutého dusíku a uchovány v kontejnerech pod hladinou tekutého dusíku.



Obr. 5. Vkládání suspenze SaO do planneru. (foto M. Pšenička)

2.6. Rozmrazení spermatogonií/oogonií

Kryotuby jsou z kontejneru nejprve přemístěny do manipulační polystyrénové nádoby s tekutým dusíkem. Rozmrazení probíhá ponořením dávky do vodní lázně s teplotou 38–40 °C po dobu cca 60 s. Ve chvíli, kdy je celý obsah dávky rozpuštěný, se vzorky umístí na led. Po rozmrazení je potřeba znovu ověřit životnost buněk pomocí kitu LIVE/DEAD® Cell Viability. Při použití tohoto postupu dosahují SaO životnosti okolo 60 % buněk. Obecně můžeme kryokonzervaci považovat za úspěšnou při dosažení životnosti buněk po rozmrazení nad 50 %.

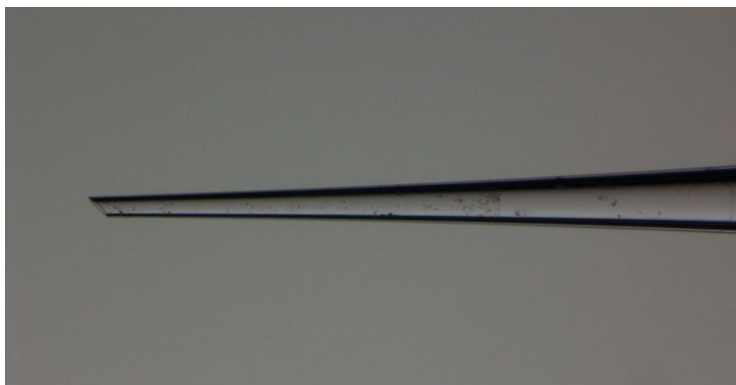
2.7. Možnosti obnovy genetického zdroje ze spermatogonií/oogonií

Suspenze čerstvých nebo rozmražených SaO se může využít k obnově genetického zdroje pomocí transplantace do stejného nebo podobného druhu jesetera. Pro transplantaci se používá mikromanipulátor s mikroinjektorem (obr. 6) a skleněnou kapilárou upravenou na rozměr 40 µm pro průchod SaO (obr. 7) (tyto kapiláry lze zakoupit již připravené např. od firmy Microtech IVF s.r.o.). Vzhledem k tomu, že SaO již nemá schopnost migrace, musí být injikovány přímo do zárodečné lišty plůdku po vykulení. Obr. 7 ukazuje značené spermatogonie jesetera sibiřského po 6 dnech od transplantace. Alternativou může být transplantace spermatogonií do testes. V obou případech je vhodné použít sterilního příjemce. Obecně se sterilizace u ryb pro tyto účely provádí triploidizací nebo hybridizací, což je v případě jeseterů problematické. Další možností je blokáce genu nutného k vývoji PGC, kterým jsou například dead end, vasa nebo nanos gen. Tato blokáce se může provádět pomocí genové modifikace, anebo změn

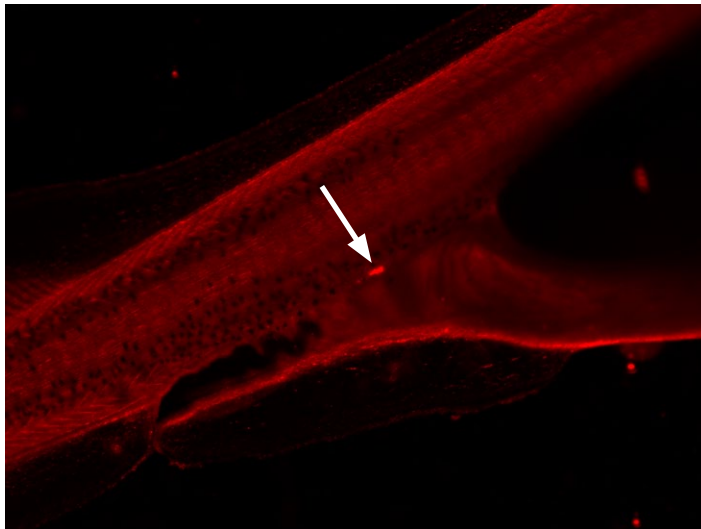
nou genové exprese pomocí Morpholino oligonukleotidu, který vyřadí funkci genu jen na dobu nutnou k přerušení vývoje PGC. Druhá zmíněná metoda blokace genu není genetickou modifikací a nepodléhá tak přísným pravidlům pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy. Další možností je transplantace spermatogonií do testes po přerušení endogenní tvorby spermií pomocí busulfanu (Lacerda a kol., 2008). Sterilizace příjemce je vždy výhodou, ovšem zárodečné buňky dárce i příjemce se spolu mohou vyvíjet i společně (obr. 8). V tomto případě pak musíme očekávat gamety pocházející od obou jedinců.



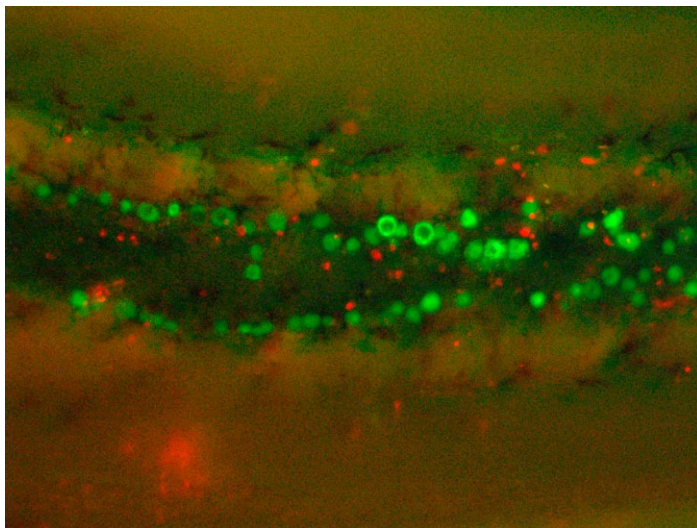
Obr. 6. Mikromanipulátor s mikroinjektorem. (foto M. Pšenička)



Obr. 7. Skleněná kapilára vytažená na přístroji Puller PC-10 a zbrúšená na mikrobrusce kapilár (Microgrinder EG-400, Narishige, Japonsko) a připravená k použití pro transplantaci spermatogonií. (foto T. Saito)



Obr. 8. Spermatoгонie jesetera malého transplantované do čerstvě vykulleného plůdku vyzy velké značené pomocí PKH26 (červené fluoescenční barvivo pro značení buněčných membrán) 6. den po transplantaci. (foto M. Pšenička)



Obr. 9. Zárodečná lišta jesetera malého 24 dní po fertilizaci s PGC zeleně značenými pomocí FITC a se spermatogoniemi jesetera sibiřského červeně značenými pomocí PKH26 14 dní po transplantaci. (foto T. Saito)

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Tato metodika je originální a první svého druhu a vychází z posledních experimentů autorského kolektivu. Metoda izolace spermatogonií pomocí separace ve hmotnostním gradientu byla popsána řadou světových autorů, ovšem tyto práce byly prováděny pouze na modelových druzích kostnatých ryb. V této metodice je popsána modifikace těchto prací pro chrupavčité druhy ryb.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Podle zákona č. 154/2000 Sb. byl Výzkumný ústav živočišné výroby v Uhřetěvsi, v.v.i. ustanoven Národním referenčním střediskem pro živočišné genetické zdroje zvířat a zároveň garantem a koordinátorem Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů. Součástí tohoto programu je konzervace genetických živočišných zdrojů autochtonních druhů ryb, kterými jsou i jeseter malý a vyza velká. Genetický živočišný zdroj může být jedinec, gamety, embrya, případně další genetický materiál, tak jako zárodečné kmenové buňky. V této metodice popisujeme způsob izolace a kryokonzervace těchto zárodečných kmenových buněk pro potřeby Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Základní chovnou jednotkou každého genetického zdroje ryb *in situ* je kmenové hejno o minimálně 120 kusech při poměru pohlaví 1 : 1 (Flajšhans a kol., 2009), ovšem pro udržení co největší genetické proměnlivosti a vzhledem k nevyzpytatelným změnám vodního prostředí, kde může náhle dojít k velkým ztrátám, se používá „záloha“ genetických zdrojů *ex situ* obvykle ve formě zamraženého spermatu. Již takové uchování genetického zdroje je ekonomické a efektivní (Linhart a kol., 2010), neboť tímto nástrojem je možné částečně snížit náklady na chov samců (mlíčáků), ovšem tato úspora nemůže být uplatněna na chov samic (jikernaček). Pomocí zmražených SaO je možná obnova nejen samčích, ale také samičích gamet. Navíc lze odběr SaO provést i krátce po úmrtí jedince, což může v případě velmi vzácných druhů jeseterů znamenat záchranu vzácného genetického zdroje.

Není možné vyčíslit přínos této metodiky exaktně. Porovnáme-li náklady na uchování genetického zdroje *in situ* s náklady na uchování *ex situ*, dobereme se určitě významného rozdílu v nákladech ve prospěch druhého ze způsobů uchování. Pokud budeme počítat pouze materiální náklady jako krmení a pomineme nákladné investice a práci pro chov např. vyzy velké, tak se dostáváme cca na 14 600 Kč ročně/ks. Kdežto

uchování jedné dávky SaO, počítáme-li spotřebu tekutého dusíku, vychází na 2,28 Kč ročně. Ovšem uchováním genetického zdroje ve formě suspenze buněk v tekutém dusíku nelze jistě plnohodnotně nahradit živého jedince.

Největší výhodou je tedy snížení ekonomické náročnosti spojené s udržováním genetického zdroje ve formě *ex situ*, ale i možnost mezinárodní výměny genetického materiálu jeseterů jednoduše ve formě zmražené suspenze buněk.

Dalším aspektem je možnost transplantace SaO z později dospívajících druhů jeseterů, jako je např. vyza velká (16–20 let) do časnějšího druhu jesetera malého (4–5 let). V tomto případě by došlo k teoretickému zkrácení generačního intervalu až 4násobně a další úspoře nákladů.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Brinster, R.L., Zimmermann, J.W., 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91(24): 11298-11302.
- de Rooij, D.G., Okabe, M., Nishimune, Y., 1999. Arrest of spermatogonial differentiation in *jsd/jsd*, *Sl17H/Sl17H*, and cryptorchid mice. Biology of Reproduction 61 (3): 842–847.
- Flajšhans, M., Cosson, J., Rodina, M., Linhart, O., 2004. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. International Journal of Cell Biology 28: 955–959.
- Flajšhans, M., Hulák, M., Kašpar, V., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., 2009. Metodika uchování genetických zdrojů ryb v živé genové bance. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 91, 35 s.
- Gela, D., Rodina, M., Linhart, O. 2008. Řízená reprodukce jeseterů (*Acipenser*). Edice Metodik, VÚRH JU, Vodňany, č. 78, 24 s.
- Kawasaki, T., Saito, K., Shinya, M., Olsen, L.C., Sakai, N., 2010. Regeneration of Spermatogenesis and Production of Functional Sperm by Grafting of Testicular Cell Aggregates in Zebrafish (*Danio rerio*). Biology of Reproduction 83 (4): 533–539.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Nagahama, Y., 1998. A novel stage-specific antigen is expressed only in early stages of spermatogonia in Japanese eel, *Anguilla japonica* testis. Molecular Reproduction and Development 51: 355–361.
- Lacerda, S., Batlouni, S.R., Assis, L.H., Resende, F.M., Campos-Silva, S.M., Campos-Silva, R., Segatelli, T.M., Franca, L.R., 2008. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Cybium 32 (2): 115–118.
- Linhart, O., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Rodina, M., 2010. Zmrazování spermatu jesetera malého (*Acipenser ruthenus*). Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, č. 101, 20 s.

- Linhart, O., Rodina, M., Boryshpolets, S., 2011. Hodnocení čerstvého spermatu ryb. Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 114, 26 s.
- Majhi, S.K., Hattori, R.S., Yokota, M., Watanabe, S., Struessmann, C.A., 2009. Germ Cell Transplantation Using Sexually Competent Fish: An Approach for Rapid Propagation of Endangered and Valuable Germlines. *Plos One* 4 (7): e6132.
- Morita, T., Kumakura, N., Morishima, K., Mitsuboshi, T., Ishida, M., Hara, T., Kudo, S., Miwa, M., Ihara, S., Higuchi, K., et al. 2012. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of Spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Biology of Reproduction United States*. pp. 176.
- Nobrega, R.H., Greebe, C.D., van de Kant, H., Bogerd, J., de Franca, L.R., Schulz, R.W., 2010. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. *Plos One* 5 (9): e12808.
- Ogawa, T., Dobrinski, I., Avarbock, M.R., Brinster, R.L., 2000. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Medicine* 6 (1): 29–34.
- Ohta, H., Yomogida, K., Dohmae, K., Nishimune, Y., 2000. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* 127 (10): 2125–2131.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2006. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8): 2725–2729.
- Okutsu, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2008. Spermatogonial Transplantation in Fish: Production of Trout Offspring from Salmon Parents. In: Tsukamoto K. Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard Jr., T.D., Kaiser, M.J. (Eds), *Fisheries for Global Welfare and Environment*. Tokyo: Terrapub. p. 209–219.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., Yamaha, E., 2008. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biology of Reproduction* 78: 159–166.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., Yamaha, E., 2010. Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *International Journal of Developmental Biology* 54: 1481–1486.
- Sbírka zákonů ČR, roč. 2006, částka 116: Vyhláška MZe ČR č. 370/2006 Sb., o odborných kurzech k výkonu některých odborných činností v oblasti šlechtění a plemenitby hospodářských zvířat. Tiskárna MV, Praha.
- Sbírka zákonů ČR, roč. 2006, částka 145: Vyhláška MZe ČR č. 447/2006 Sb., o genetických zdrojích zvířat. Tiskárna MV, Praha.

- Rodina, M., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Linhart, O., 2010 Zmrazování spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) pro potřeby uchování genofondu v praktických podmínkách. Edice Metodik (technologická řada), FROV JU, Vodňany, č. 102, 25 s.
- Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M., Yoshizaki, G., 2009. Development of Spermatogonial Cell Transplantation in Nibe Croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). Biology of Reproduction 81 (6): 1055–1063.
- Wong, T.T., Saito, T., Crodian, J., Collodi, P., 2011. Zebrafish Germline Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae. Biology of Reproduction 84 (6): 1190–1197.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Tato metodika je originální a recentní prací a žádné jiné práce jí nepředcházely. Některé poznatky vycházely z prací zahraničních autorů, kde je jedním z autorů i Dr. Taiju Saito, který je nyní členem našeho týmu a spoluautorem této metodiky.
- Wong, T.T., Saito, T., Crodian, J., Collodi, P., 2011. Zebrafish Germline Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae. Biol Reprod. 84 (6):1190–1197. (dedikace: NIH R01GM069384 from the National Institutes of Health)
- Yamaha, E., Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., 2007. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. Journal of Sea Research 58: 8–22. (dedikace: 21st Century COE Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan)

Externí odborný oponent

doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.
Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.
Václavská 1083, 142 20 Praha 4

Interní odborný oponent

Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné
centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický,
Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany

Oponent za státní správu

Ing. Vladimír Gall
MZe Praha
Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství (16230)
Těšnov 17, 117 05 Praha 1

**Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. 129/2012 – 16230/Nmet
certifikovaná metodika ze dne 21. 12. 2012**

Vydalo: Ministerstvo zemědělství, úsek lesního hospodářství, Sekce lesního hospodářství,
Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 17, 117 05 Praha 1.

Adresa autorského kolektivu

Ing. Martin Pšenička, Ph.D. 40 %
Tajju Saito, M.Sc. Ph.D. 20 %
Ing. Marek Rodina, Ph.D. 20 %
Mgr. Zuzana Linhartová 10 %
doc. Ing. Martin Flajšhans, Dr.rer.agr. 10 %

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné
centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz a Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický,
Zátiší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz

V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Fakulta rybářství a ochrany vod.

Redakce: Ing. Blanka Vukusová, CSc., dr. hab Ing. Josef Velíšek, Ph.D., Zuzana Dvořáková

Náklad: 200 ks, vtištěno v roce 2012, 1. vydání
Grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk



EVROPSKÁ UNIE

EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND

„Investování do udržitelného rybolovu“

