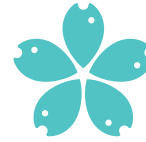




Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Zmrazování zárodečných buněk kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a jejich využití k transplantaci do náhradních rodičů pro účely reprodukce

R. Franěk, V. Kašpar, M. Pšenička



ISBN 978-80-7514-098-2





Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Zmrazování zárodečných buněk kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a jejich využití k transplantaci do náhradních rodičů pro účely reprodukce

R. Franěk, V. Kašpar, M. Pšenička

Vodňany



EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství

Příprava a vydání publikace byly uskutečněny v rámci

Operačního programu Rybářství 2014–2020:

Projekt Metodika V, reg. č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/19_014/0000889

byl spolufinancován Evropskou unií

Obsahová část publikace je výsledkem řešení výzkumných projektů:

*Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže
a tělovýchovy České republiky – projekty CENAKVA (LM2018099)*

*a Biodiverzita (Reprodukční a genetické postupy pro uchování biodiverzity
ryb a akvakulturu) (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007370) – 50%, Národní
agentury pro zemědělský výzkum QK1910428 Uchovávání genetických zdrojů
kapra obecného in vitro a tvorba isogenních linií pomocí transplantace
zárodečných buněk – 50%*



č.178

ISBN 978-80-7514-098-2

OBSAH

1. CÍL METODIKY	7
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
2.1. Úvod	7
2.2. Odběr tkáně gonád	12
2.3. Zmrazování tkáně gonád	14
2.4. Rozmrazení tkáně gonád	16
2.5. Disociace gonád	16
2.6. Kontrola životaschopnosti buněk	16
2.7. Aplikace zmrazených a rozmrazených buněk	18
3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	24
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	24
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	25
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	26
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	30

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je popsat manipulaci se samčími (spermatogonie) a samičími (oogonie) zárodečnými kmenovými buňkami kapra obecného (*Cyprinus carpio*) zahrnující jejich izolaci, zmrazování a transplantaci do náhradních rodičů za účelem zefektivnění držení genových rezerv *ex situ*.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Obsah metodiky lze shrnout následovně: po usmrcení jedince je asepticky odebrána celá gonáda, ve které se nacházejí zárodečné kmenové buňky. Tkáň gonád je rozdělena na menší fragmenty (~100 mg), které jsou zmrazeny technikou pomalého mrazení (-1 °C.min⁻¹), kdy po dosažení -80 °C mohou být uchovány v tekutém dusíku po dlouhou dobu. Pro rozmrazení jsou kryozkumavky se zmrazenou tkání vyjmuty z dusíku a ohřáty ve vodní lázni. Tkáň gonád je následně rozmělněna a enzymaticky disociována do podoby buněčné suspenze. Získaná suspenze ovariálních či testikulárních buněk je následně pročištěna použitím hustotního gradientu. Buňky jsou v dalším kroku transplantovány do rozplavaných larev náhradních rodičů, ve kterých kolonizují gonádu, a v budoucnu produkují gamety donora.

2.1. Úvod

Kapr obecný patří mezi nejstarší domestikované druhy ryb na světě (Balon, 1995), kdy celosvětová roční produkce v akvakultuře (více než 4 miliony tun) řadí kapra mezi nejdůležitější produkované druhy ryb (FAO, 2016). Dlouhotrvající historie a popularita kapra v akvakultuře dala vzniknout mnoha liniím a plemenům, které jsou naprosto zásadní pro šlechtitelskou práci a produkci užitkových hybridů především v Evropě (Gorda kol., 1995; Bakos a kol., 2001). Odrazem mimořádného významu kapra je vytvoření metod pro uchování genetických rezerv zahrnujících chov živých jedinců (Flajšhans a kol., 1999), identifikaci jejich genetické diverzity (Crooijmans a kol., 1997; Kohlmann a kol., 2005; Hulák a kol., 2010; Xu a kol., 2014) a postupy pro uchování genetických rezerv *ex situ* prostřednictvím zmrazeného spermatu v kryobankách (Lubzens a kol., 1997; Linhart a kol., 2000; Horváth a kol., 2007). Nicméně, doposud vyvinuté strategie konzervace genetických rezerv nelze považovat za plnohodnotné, jelikož není možné uchovat samičí zdroje *ex situ*. Z tohoto důvodu je do budoucna nutné u ryb uvažovat nad začleněním alternativních strategií, které využívají recentní biotechnologické poznatky a mají potenciál vyřešit současné problémy. Jednou z možných alternativ je začlenění metod manipulací se zárodečnými kmenovými buňkami.

Všechny organizmy s pohlavním rozmnožováním mají dvě odlišné buněčné linie, které se diferencují během velmi raného embryonálního vývoje. Tělo je tvořeno ze somatické linie, která je považována za „smrtelnou“, jelikož tyto buňky se za normálních podmínek neúčastní procesu předávání DNA do další generace. Linie zárodečných buněk je opakem somatické linie, a tudíž může být považována za „nesmrtelnou“, jelikož je schopna podstoupit samoobnovení, ale i diferenciaci včetně redukčního dělení (meióza), při které vznikají vajíčka a spermie, čímž je zajištěno předávání DNA napříč generacemi prostřednictvím gamet. Zárodečná linie je založena primordiálními gonocyty, které z místa jejich specifikace migrují do genitální rýhy – místa založení budoucí gonády. Primordiální gonocyty usazené v místě genitální rýhy následně proliferují a procházejí pohlavní diferenciací ve spermatogonie nebo oogonie (Braat a kol., 1999; Yoshizaki a kol., 2002). Proces diferenciacie pohlaví u ryb je determinován genetickými faktory, ale zásadní roli má také vliv endokrinního řízení a vnější faktory, které ve výsledku mohou překonat primární genetickou determinaci pohlaví (Strüssmann a Nakamura, 2002). Diferenciacie pohlaví není vždy přímý proces, kdy například na modelu dánia pruhovaného (*Danio rerio*) bylo prokázáno, že všichni juvenilní jedinci vytvářejí takzvané juvenilní ovarium, kdy následná míra apoptózy zárodečných buněk určuje, zdali se gonáda bude vyvíjet dále v ovarium, nebo dojde k vytvoření testes (Pradhan a Olsson, 2014). Kapacita gonád produkovat gamety je zajištěna schopností samoobnovení spermatogonií a oogonií, kdy následně část buněk vstupuje do meiotického dělení. Typ A nediferenciovaných spermatogonií je schopný znovu vstoupit do mitózy a produkovat dceřiné spermatogonie typu A, nebo se diferenciovat ve spermatogonie typu B, které podstupují mitotické a meiotické dělení, kdy vznikají primární a sekundární spermatocyty, dále se diferencující ve funkční spermie (Schulz a kol., 2010). Vývoj samičí gonády ve zkratce zahrnuje proliferaci oogonií a následnou diferenciaci v premeiotické oocyty a jejich vitelogenní růst. V průběhu vitelogeneze dochází k vývoji vnitřních a vnějších obalů oocyty. Před samotnou ovulací dochází k rozpadu zárodečného měchýřku (jádra oocyty). Samotná ovulace zahrnuje prasknutí folikulu, kdy po následném oplození spermii dochází k odchodu druhého pólového tělíska. Výsledkem je následně fúze dvou haploidních jader, která dávají vzniku diploidní zygotě (Lubzens a kol., 2010).

Termínem zárodečná buňka je označováno jakékoliv stadium od primordiálního gonocytu přes spermatogonii/oogonii až po oplozeníschopnou spermii či oocyt. Avšak pro účely manipulace zárodečných kmenových buněk je nutné specifikovat, že cílem těchto technik jsou pouze buňky zachovávající si „kmenovost“, tudíž schopnost sebeobnovení prostřednictvím mitotického dělení – jedná se tedy o embryonální primordiální gonocyty a spermatogoniální či oogoniální kmenové buňky.

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

Na modelu myši bylo objeveno, že zárodečné kmenové buňky lze efektivně izolovat, zmrazit (Avarbock a kol., 1996) a následně transplantovat. Transplantované kmenové zárodečné buňky jsou schopny kolonizovat gonádu hosta a posléze produkovat gamety dárce (Brinster a Zimmermann, 1994). Organismus, do kterého byly vpraveny zárodečné buňky jiného jedince, se nazývá chimérou zárodečné linie.

První studie popisující transplantaci spermatogonií u ryb do alogenních recipientů (recipienti stejného druhu) byly provedeny na pstruhovi duhovém (*Oncorhynchus mykiss*) (Okutsu a kol., 2006, 2007), kdy bylo popsáno, že spermatogonie úspěšně kolonizovaly genitální rýhu, a především se byly schopny diferenciovat ve funkční spermie, ale i transdiferenciovat v oocyty, čímž byla potvrzena jejich kmenovost. Dalším důležitým faktem je, že nebyl zjištěn rozdíl v procentu pozitivních chimér zárodečné linie u samců a samic, kdy navíc porovnání vývoje gonád mezi kontrolou a chimérami ukázalo, že transplantované buňky jsou schopny udržovat srovnatelné tempo vývoje s kontrolou, tudíž nedochází k opoždění vývoje gonád a je vysoce pravděpodobné, že transplantované buňky se vyvíjí jako buňky těla vlastní. Další studie na pstruhovi duhovém potvrdily předpoklad, že i ovaria obsahují populaci oogoniálních kmenových buněk. Po jejich transplantaci do samčích recipientů bylo dosaženo produkce spermatu (Yoshizaki a kol., 2010).

Následně byla potvrzena možnost transplantace spermatogonií a oogonií do rodičů jiného příbuzného druhu. Tato skutečnost je jedním z hlavních důvodů, proč je důležité se náhradním rodičovstvím u ryb zabývat. Vhodným výběrem rodiče lze dosáhnout zmenšení nároků na prostor potřebný pro odchov, ale i zkrácení reprodukčního cyklu cílového druhu. Například pro tuňáka modroploutvého (*Thunnus orientalis*) bylo testováno již několik druhů náhradních rodičů včetně makrely japonské (*Scomber japonicus*) (Yazawa a kol., 2013) a kranase amerického (*Seriola lalandi*) (Bar a kol., 2016). Podobně je uvažováno i o náhradní reprodukci velkých druhů jeseterů s velice dlouhou dobou dospívání prostřednictvím jesetera malého jako náhradního rodiče (Linhartová a kol., 2015; Pšenička a kol., 2016; Baloch a kol., 2019).

Vývoj postupů pro transplantaci zárodečných buněk umožňuje náhradní rodičovství u ryb spojit s jejich zmrazováním, kdy následně vzniká velice komplexní přístup s potenciálem pro akvakulturu, management genetických rezerv, ale i uchování cenných experimentálních linií. Vývoj a následné zahrnutí technologií zárodečných kmenových buněk ryb do programů uchování genetických zdrojů může znatelně snížit riziko ztráty vzácných linií či druhů v důsledcích nemocí, přírodních katastrof, ale i nepředvídatelného selhání chovatelských technologií. Zárodečné kmenové buňky ve zmrazeném stavu lze navíc chápat jako účinnou metodu pro redukci prostoru nutného pro držení živých genetických rezerv.

Obecně lze postupy pro zmrazování definovat jako snahu vyvinout protokoly pro uchování tkání/buněk v teplotách pod bodem mrazu pro potřebnou dobu uchování (obvykle roky až desetiletí). Proces postupu zmrazování se skládá z 1) odběru tkáně gonád, 2) přípravy a následné optimalizace složení kryoprotektantů, 3) vlastního zmrazovacího procesu, 4) uchování biologického materiálu a 5) obnovení biologického materiálu rozmrazením a jeho následnou aplikací. Každý z výše zmíněných kroků by měl být optimalizován (např. optimalizace kryoprotektantu a technika zmrazování). Tím lze dosáhnout minimálního poškození mrazem a samotným mrazením, cílem je pak získání dostatečného množství buněk v dobrém fyziologickém stavu po rozmrazení umožňující jejich následnou aplikaci (Mazur, 1963, 1984). Současné možnosti pro zmrazování genetických zdrojů ryb jsou sumarizovány v Tab. 1.

Zárodečné kmenové buňky ryb lze zmrazovat využitím dvou postupů lišících se především v rychlosti, jakou je vzorek uveden do plně zmrazeného stavu (-196 °C). Ultra rychlé mrazení – vitrifikace, je postup využívající vysoce koncentrovaných kryoprotektantů, které spolu s rapidním poklesem teploty brání tvorbě ledových krystalků (Seki a kol., 2017; Higaki a kol., 2018). Opakem vitrifikace je pomalé, kontrolované mrazení, které využívá méně koncentrovaných kryoprotektantů. Obecně akceptována rychlost mrazení (-1 °C.sec⁻¹) zajišťuje postupný odchod vody z buněk a její nahrazení kryoprotektantem, který následně minimalizuje tvorbu vnitrobuněčného ledu. Po dosažení teploty -80 °C je přechod kapalin ukončen a následně je biologický materiál uchován v tekutém dusíku (Lee a kol., 2016b).

V současné době bylo zmrazení zárodečných kmenových buněk úspěšně provedeno u 13 druhů ryb, především pak u zástupců kaprovitých ryb (Linhartová a kol., 2014; Marinović a kol., 2016, 2018; Higaki a kol., 2018) a lososovitých ryb (Lee a Yoshizaki, 2016; Lujic a kol., 2017). Avšak pouze u 6 druhů následovala transplantace rozmrazených buněk do náhradních rodičů (Lacerda a kol., 2013; Lee a kol., 2013, 2015, 2016a,b; Pšenička a kol., 2016; Hamasaki a kol., 2017; Franěk a kol., 2019a,b). Vzhledem k počtu akvakulturně využívaných druhů nebo ohrožených populací volně žijících druhů se stále jedná o poměrně unikátní biotechnologii, která je na počátku vývoje a do budoucna lze očekávat, že bude rozšířena i na další komerčně významné druhy.

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNĚHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

Tab. 1. Souhrnné porovnání metod pro zmrazování genetiických zdrojů ryb.

Druh genetiického zdroje	Genetiický materiál je získán	Opakované získání genetiického materiálu z jedince	Snadnost získání a přípravy s dostupnými materiály pro zmrazování	Počet druhů s dostupnými protokoly pro zmrazování	Metoda zmrazování	Potenciál pro genetiické banky	Účinnost protokolu pro zmrazování	Aplikace rozmraženého genetiického materiálu
spermie	dospělec	ano	snadné	více než 50 druhů		vyšoký	vyšoká	oplození
zralé	dospělec	ano	snadné	x		ne	nelze	oplození
oocyty	juvenilní/dospělec	ano/ne*	mírně obtížné	x		ne	nelze	buněčná kultura/transplantace a následné oplození
embrya	několik hodin/dní po oplození	ne	obtížné	#	pomalé mrazení/vitrifikace	nelze hodnotit	velmi nízká	odchov embryí
primordiální gonocyty	několik hodin/dní po oplození	ne	velmi obtížné	4 druhy		střední	střední	transplantace do náhradních rodičů/ <i>in vitro</i>
zárodečné buňky	juvenilní/dospělec	no/ne*	snadné	11 druhů		vyšoký	vyšoká	
	juvenilní/dospělec	ano/ne*	snadné	5 druhů		vyšoký	vyšoká	

*Závisí na metodě odběru tkáně/buňky, lze odebrat po usmrcení jedince, ale i opakovaně pomocí biopsie.

x V současné době není znám vhodný protokol pro zmrazení oocytů.

Vyvinutý protokol využívající injekci nanočástic (částice o velikosti jednotek až desítek nanometrů, které jsou obklopené mezifázovou vrstvou) do embrya, zmrazení embrya běžnou technikou vitrifikace a následně rovnoměrné rozmrazení embrya pomocí laseru, který rozkmitá nanočástice, je pravděpodobně aplikovatelný pro všechny druhy ryb s meroblastickým dělením a chorionem umožňujícím mikroinjekci nanočástic spolu s kryoprotektantem, nicméně zmrazení a rozmrazení embrya nebyla následně odchována, tím pádem ani nebyla potvrzena možnost jejich reprodukce a možný negativní vliv nanočástic na další vývoj organismu.

2.2. Odběr tkáně gonád

Pro účely získání zárodečných buněk je vhodné selektované jedince držet několik dnů před samotným odběrem bez krmení, čímž dojde k vylučnění, sníží se naplněnost střev, a tím pádem i riziko jejich protržení v průběhu disekce gonád. Před samotným odběrem gonád je důležité zvážit vhodnou velikost a věk daného jedince. Obecně jsou vhodnější juvenilní ryby, v případě kapra jedinci o věku 1–2 roky s váhou do 100 g. Teoreticky je možné tkáň gonád odebírat i z dospělých jedinců, avšak relativní podíl zárodečných kmenových buněk klesá ve prospěch spermií, resp. dozrávajících oocytů. Z tohoto důvodu se pro účely zmrazování jeví využití juvenilních ryb jako efektivnější z hlediska práce, ale i z důvodů úspory místa pro uchování zmrazeného materiálu v tekutém dusíku.

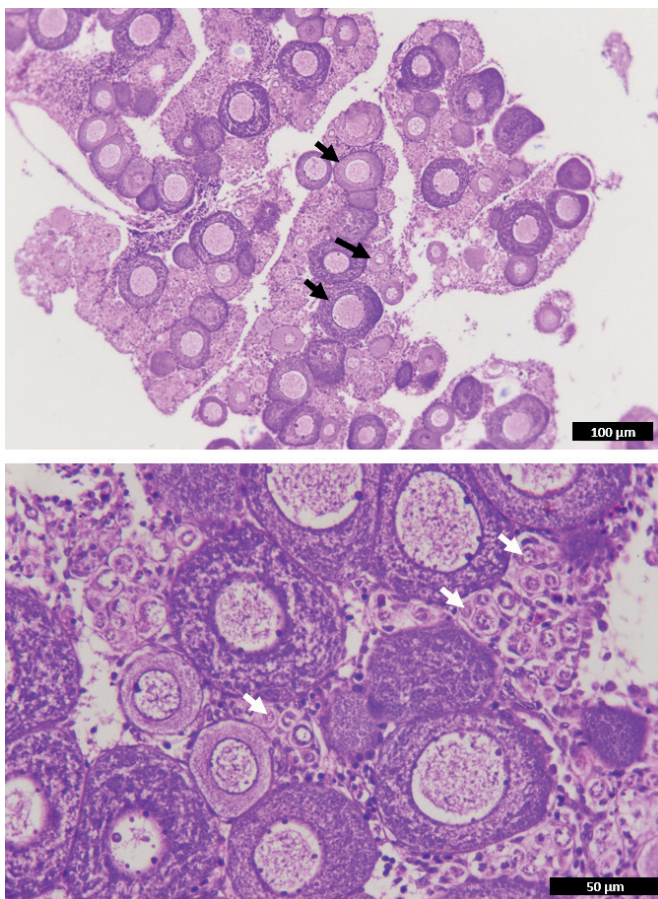


Obr. 1. Otevření tělní dutiny u juvenilního samce kapra před vyjmutím testes (Foto: R. Franěk).

Usmrcení jedince je provedeno předávkováním anestetikem (MS222). Následně je vhodné povrch těla dezinfikovat 70% etanolem a otřít. První řez je veden břišní stěnou v mediální rovině od hlavy k řitnímu otvoru s maximální opatrností, aby nedošlo k perforaci zažívacího traktu a kontaminaci tělní dutiny střevními bakteriemi. Další řez je veden za hlavou kolmo směrem k hřbetu po levé i pravé straně těla ryby. Následně je vhodné uvolnit fascie tělní dutiny

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

od orgánů a fixovat volnou svalovinu po obou stranách. Tímto způsobem je ryba orientována hřbetem dolů a tělní dutina je otevřena do tvaru V (Obr. 1). Zaživací trakt je s maximální opatrností odstraněn, aby došlo k odkrytí gonád, které jsou vyjmuty a uloženy do pufovaného fyziologického roztoku (PBS). Vyjmutou gonádu je vhodné očistit od tukové tkáně a krevních kapilár. V případě potřeby zpracovat větší množství jedinců/tkáně je možné již vyjmutou a očištěnou gonádu držet v roztoku PBS na ledu (cca. 4 °C) po dobu několika hodin bez ztráty životaschopnosti buněk.



Obr. 2. Histologický řez ovarii kapra obecného ve vhodném stadiu vývoje pro zmrazení, kdy se ovarium skládá z previtelogenních oocytů do velikosti 100 μm (černé šipky) a oogonií (bílé šipky) (Foto: R. Franěk).

2.3. Zmrazování tkáně gonád

Pro ochranu tkáně a buněk před škodlivými účinky zmrazování, které způsobují osmotický šok, ale i tvorbu intracelulárního ledu, je nutné připravit kryoprotektant, ve kterém bude tkáň zmrazena a uchována. Současné studie ukazují, že neexistuje univerzální složení kryoprotektantu, který by byl aplikovatelný pro všechny druhy ryb. Z tohoto důvodu je před samotným konzervováním tkáně gonád z cenných jedinců nutné otestovat vhodnost jednotlivých kryoprotektantů a optimalizovat jejich koncentraci včetně dalších složek kryomédia.

Pro zmrazování tkáně testes kapra je nejvhodnější kryoprotektant skládající se z 2M dimetylsulfoxidu (DMSO), 0,3M glukózy, 10% fetálního hovězí séra (FBS), kdy jsou všechny komponenty rozpuštěny v PBS. Tkáň testes je vhodné rozdělit na menší kousky (cca 100 mg), což zajistí rovnoměrnou penetraci kryoprotektantu, zároveň však takovýto fragment obsahuje již několik desítek tisíc spermatogonií. Samotným postupem je příprava kryoprotektantu, jeho napipetování do 2ml kryozkumavek a vložení vždy jednoho kusu tkáně testes. Takto připravené zkumavky jsou uchovány po dobu 30 min na ledu. Samotné zmrazení může být provedeno v zařízení s kontrolovatelným poklesem teploty. Stejných výsledků lze dosáhnout použitím mrazicích krabiček (Obr. 3), které jsou umístěny na suchý led nebo do hlubokomrazicího boxu (-80 °C) po dobu cca 3–4 hodin. Mrazicí krabičky jsou vyrobeny tak, aby bylo dosaženo optimální rychlosti mrazení $-1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Po 3–4 hodinách mohou být kryozkumavky s tkání gonád přemístěny do tekutého dusíku. Alternativně lze uchovat zmrazenou tkáň v -80 °C po dobu 24 hodin bez ztráty životaschopnosti buněk.

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (CYPRINUS CARPIO) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE



Obr. 3. Mrazicí krabičky s kapacitou pro 12 a 30 kryozkumavek o objemu 2ml, které po vložení do hlubokomrazacího boxu (-80 °C) zajišťují kontrolovaný pokles teploty -1 °C.min⁻¹ (Foto: R. Franěk).

Pro přípravu 100 ml kryomédia na zmrazování testikulární tkáně je potřeba:

- 14,2 ml DMSO
- 5,4 g glukózy
- 10 ml FBS
- doředit na 100 ml 1x roztokem PBS

Protokol pro zmrazení tkáně ovárií je obdobný s tím rozdílem, že je použito 1,5M DMSO, 0,3M glukóza a 10% fetální hovězí sérum. Optimální velikost fragmentu ovárií je 100mg, avšak je vhodné umístit tkáň do kryoprotektantu a ponechat ji v něm po dobu 60 min. Samotný mrazicí proces je pak proveden v mrazicích krabičkách (polypropylenové boxy, které po vložení do hlubokomrazacího boxu zajistí postupné zmrazení vložených kryozkumavek s biologickým materiálem rychlostí cca -1 °C/min) a po dosažení -80 °C jsou kryozkumavky umístěny do tekutého dusíku. Tímto způsobem lze tkáň gonád uchovat až v řádu desítek let bez nebezpečí degradace tkáně a ztráty životaschopnosti buněk.

Pro přípravu 100 ml kryomédia na zmrazování ovariální tkáně je potřeba:

- 10,65 ml DMSO
- 5,4 g glukózy
- 10 ml fetálního hovězího séra
- doředit na 100 ml 1x roztokem PBS

2.4. Rozmrazení tkáně gonád

S použitím předepsaných ochranných pomůcek jsou kryozkumavky vyjmuty z tekutého dusíku a neprodleně ponořeny do vodní lázně o teplotě 26 °C. Během 1–2 minut dojde k částečnému rozmrazení kryoprotektantu. Obsah kryozkumavky je následně převeden na Petriho misku a rozmrazená tkáň je pinzetou individuálně umístěna na 24jamkovou destičku s L-15 médiem (Leibovitzovo médium bez L-glutaminu) v pokojové teplotě, kde je dvakrát promyta v objemu 1–2 ml média na jeden fragment tkáně gonád.

2.5. Disociace gonád

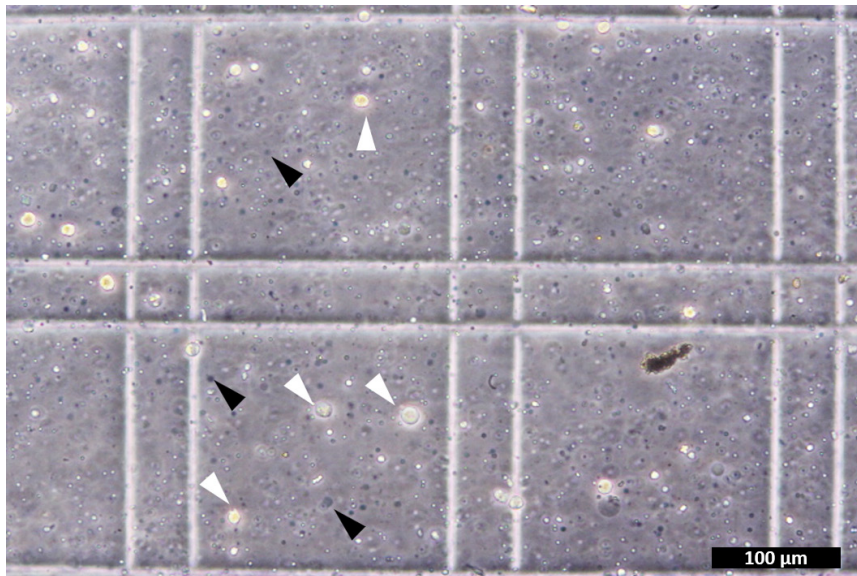
Jednotlivé fragmenty gonád jsou umístěny do 2 ml zkumavek, ve kterých jsou rozstříhány tak, aby bylo dosaženo přibližně stejně velkých fragmentů. Rozstříhaná gonáda je disociována 0,1% trypsinem v PBS. Na 100 mg tkáně je nutné použít minimálně 1 ml disociačního média. Disociace probíhá na třepačce v pokojové teplotě po dobu 1–2 hodin v závislosti na velikosti rozstříhaných fragmentů a tkáni gonád (obecně je disociace tkáně ovarií kratší). Proces disociace je následně zastaven přidáním stejného objemu L-15 média s 10% FBS. Suspenze buněk je přefiltrována přes filtr o velikosti pórů 30–40 µm. Dalším krokem je centrifugace buněk při rychlosti 0,3g po dobu 10 min. Supernatant nad vytvořenou peletou buněk se odsaje a následně je peleta buněk resuspendována v odpovídajícím objemu L-15 média s 10% FBS (obvykle 100 µl na 100 mg disociované tkáně). Takto připravenou buněčnou suspenzi lze na ledu uchovávat po dobu několika hodin.

2.6. Kontrola životaschopnosti buněk

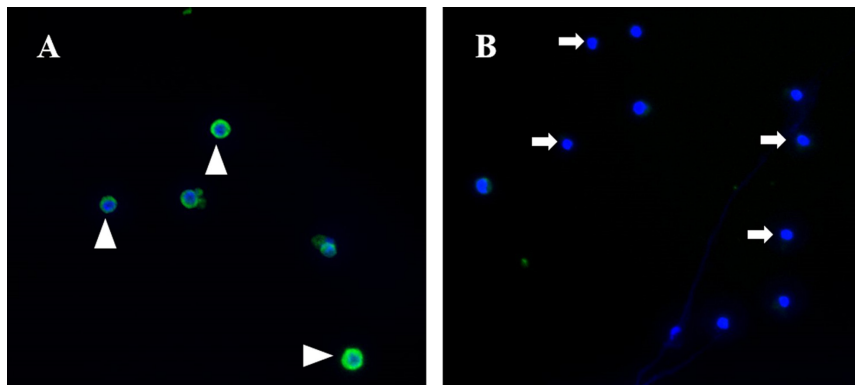
Resuspendované buňky jsou obarveny 1 : 1 roztokem 0,4% trypanové modři v PBS, která proniká do mrtvých buněk a zabarví je tmavě (Obr. 4), zatímco živé buňky zůstávají transparentní. Při použití výše zmíněných protokolů pro zmrazení tkáně gonád je dosahováno 40% přežití u spermatogonií a 65% u oogonií v porovnání s nezmrazenou kontrolou. Zásadní výhodou tohoto

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

postupu je, že buňky, které nepřežily mrazení, jsou následně rozpuštěny trypsinem, tím pádem není finální buněčná suspenze kontaminována a přibližně z 95 % obsahuje živé buňky. Dále je možné ověřit identitu zmrazených buněk barvením pomocí specifických protilátek (Obr. 5).



Obr. 4. Disociovaná suspenze zmrazených/rozmrazených spermatogonií při počítání přežití s použitím Bürkerovy komůrky. Bílé trojúhelníky označují živé spermatogonie neobarvené trypanovou modří. Černé trojúhelníky označují mrtvé (tmavě zbarvené) buňky, kdy se převážně jedná o spermie (Foto: R. Franěk).



Obr. 5. A – Imunofluorescenční značení zmrazených/rozmrazených samičích zárodečných buněk kapra obecného pomocí protilátky detekující protein specifický pro zárodečné buňky, (DDX4) na kterou je následně fluorescenčně značená sekundární protilátka konjugovaná s fluorescein-5-isothiokyanátem. B – kontrolní buňky získané z ploutevní tkáně bez pozitivního barvení protilátkou. Buněčná jádra jsou barvena modře pomocí 4',6-diamidin-2-fenylindolu. Převzato z publikace Fraňka a kol. (2019b).

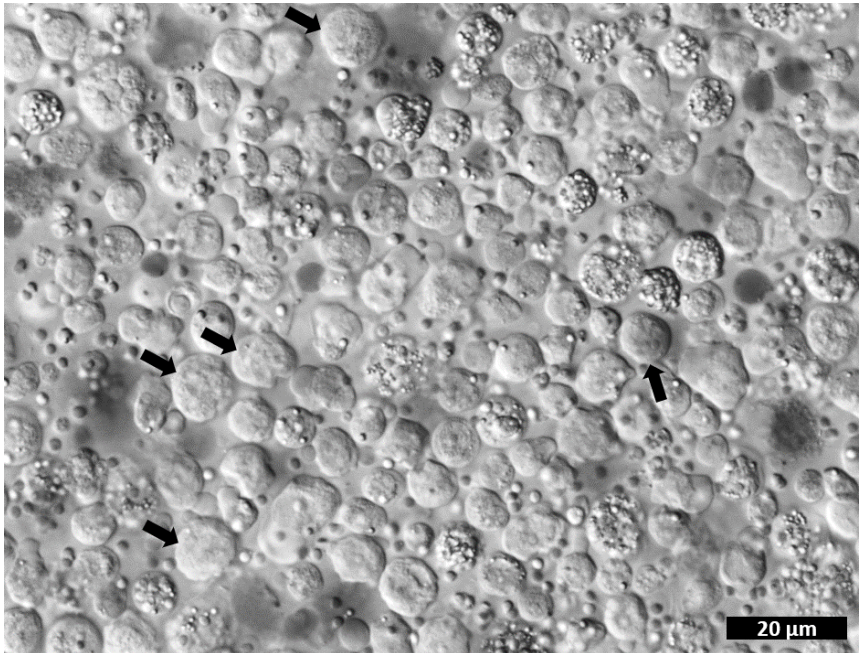
2.7. Aplikace zmrazených a rozmrazených buněk

Pro účely obnovení zárodečných buněk, které byly zmrazeny a následně rozmrazeny, je nutné transplantovat je do těl náhradních rodičů – recipientů. Pro kapra obecného se jako vhodný recipient jeví zlatá forma karase obecného, jelikož dosahuje rychleji pohlavní dospělosti, váha generačních ryb je přibližně 10x menší, navíc karas vykazuje rezistenci vůči chorobám, ke kterým je kapr obecný vnímavý a představují pro něj vážnou hrozbu (koi herpes virus). Navíc je možné karase účinně sterilizovat, což zaručí lepší přijetí transplantovaných buněk, a především pak produkci pouze gamet kapra, které by v případě použití nesterilních jedinců byly „kontaminovány“ gametami karase. Sterilizace recipientů je zajištěna pomocí netransgenní technologie, kdy je dočasně blokována translace *dead end* genu, který je zodpovědný za migraci a raný vývoj primordiálních gonocytů. Chemikálie blokující translaci – antisense morpholino oligonukleotid, navržený proti *dead end* genu, je injikována do embryí ve stadiu 2–4 buněk. K samotné transplantaci se přistupuje poté, co jsou larvy rozplavané a přijímají exogenní výživu (mezi 7.–10. dnem po oplození).

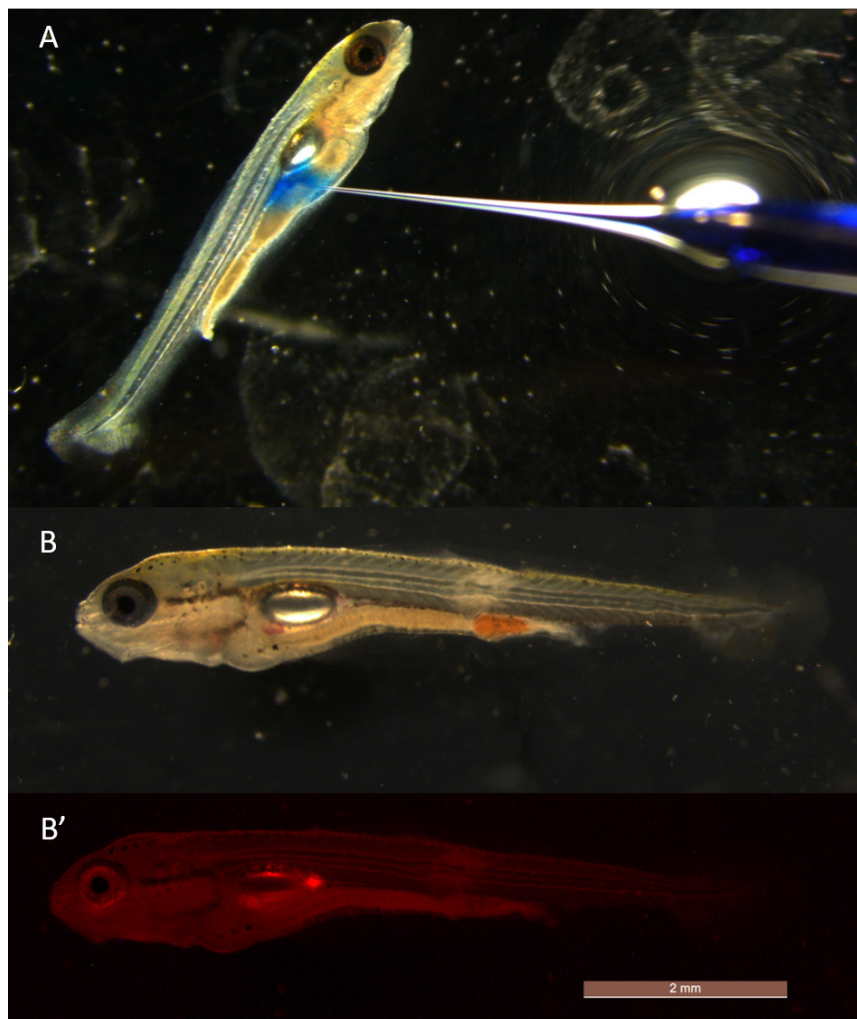
Připravená buněčná suspenze (Obr. 6) je napipetována do skleněné kapiláry připevněné na mikromanipulátor s injektorem u stereomikroskopu. Pro transplantaci jsou larvy recipientů uspány v 0,05% roztoku MS222. Buněčná suspenze je injikována do tělní dutiny v blízkosti genitální rýhy (Obr. 7).

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

Obvykle je transplantováno několik tisíc buněk. Pro účely monitorování buněk po transplantaci je možné využít komerčně dostupných membránových barviv (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit), které jsou fluorescenčně značené. Tímto postupem lze detekovat buňky až po dobu 3 měsíců po transplantaci a následně předběžně vyhodnotit úspěšnost provedené transplantace (Obr. 8). Po transplantaci probíhá odchov recipientů standardním způsobem.

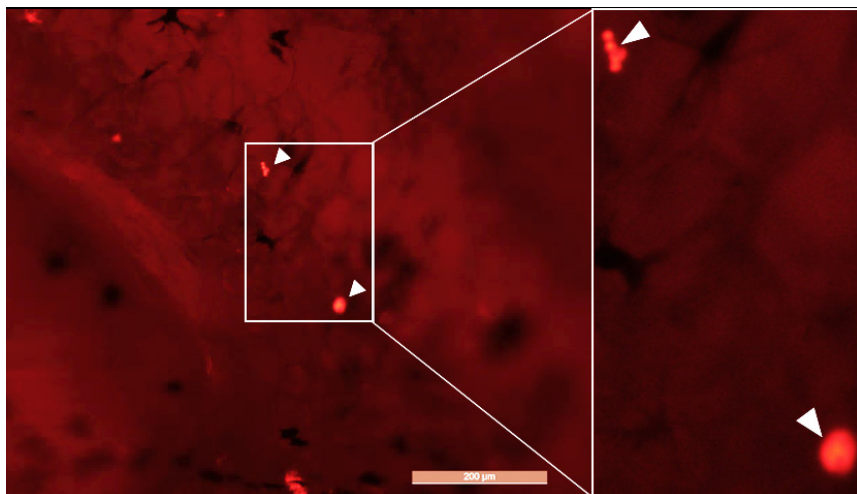


Obr. 6. *Suspenze izolovaných testikulárních buněk z kapra, které byly následně purifikovány pomocí 30% hustotního gradientu, který ze suspenze odstraní značnou frakci spermií a zvýší podíl raných stadií zárodečných buněk (označeny černou šipkou), Nomarského diferenciální kontrast (Foto: M. Pšenička).*



Obr. 7. Intraperitoneální transplantace fluorescenčně značených (PKH-26) zárodečných buněk kapra do larvy karase obecného. A – injikovaná suspenze je obarvená methylenovou modří pro lepší viditelnost. B – snímek (světlé pole) transplantované larvy karase. B' – fluorescenční snímek na kanálu dsRed, který umožňuje detekovat transplantované buňky se značenými membránami pomocí PKH-26. Převzato a upraveno podle Fraňka a kol. (2019b).

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

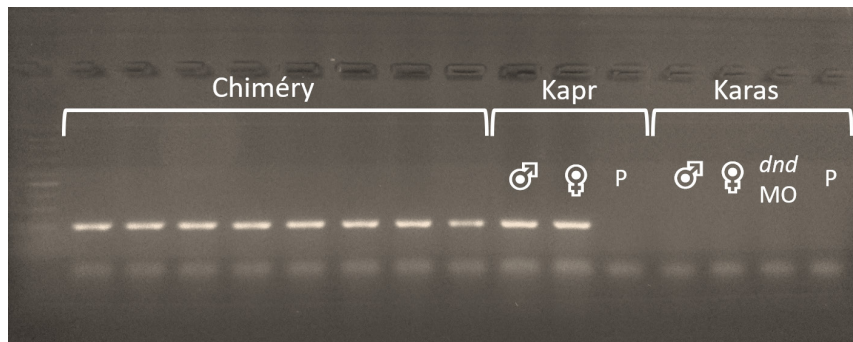


Obr. 8. Proliferační transplantačních a fluorescenčně značených (PKH-26) oocytů v těle recipienta 6 týdnů po transplantaci. Výřez vpravo označuje zvětšený pohled na buňky v gonádách recipienta. Převzato a upraveno podle Fraňka a kol. (2019b).

Dva měsíce po transplantaci je 40–60 % recipientů pozitivních na přítomnost zárodečných buněk. Dle získaných výsledků je možné tvrdit, že kolonizační a proliferační kapacita zmrazených a nezamrazených buněk se neliší. Při velikosti těl recipientů v řádu několika cm je možné gonádu snadno vyjmout a provést molekulární analýzu pro potvrzení úspěšné transplantace (Obr. 9). Po dosažení pohlavní dospělosti náhradních recipientů (2–3 roky) jsou produkovány gamety donora. Protože má karas determinaci pohlaví nezávislou na přítomnosti zárodečných buněk, dochází k tomu, že poměr chimérických samců a samic je dle našich výsledků téměř vyrovnaný bez ohledu na typ transplantačních zárodečných buněk. Další velice podstatnou skutečností je, že spermatogonie a ogonie jsou kmenové buňky, tzn., že jsou schopny se transdiferenciovat v těle recipienta do opačného pohlaví (Obr. 10).

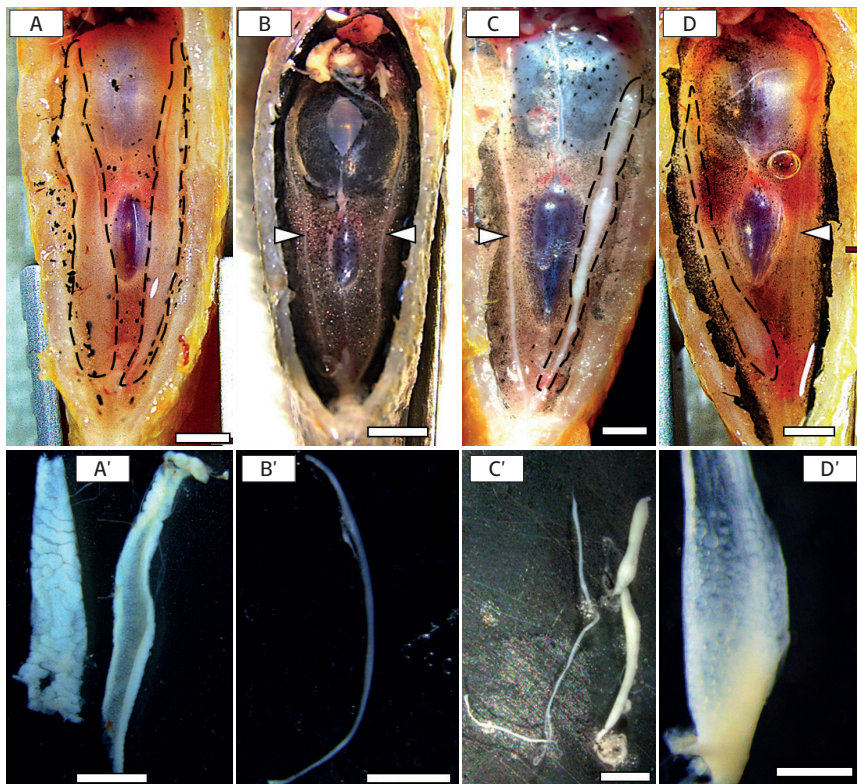
Díky kmenovosti zárodečných buněk je v případě transplantace spermatogonií (pohlavní chromozomy XY) dosaženo produkce oocytů i spermií nesoucí chromozom X nebo Y. Možným výsledkem křížení chimér zárodečné linie v případě transplantace spermatogonií může tedy být potomstvo nesoucí XX, XY a YY pohlavní chromozomy. Při transplantaci oocytů náhradní rodiče produkují spermie a oocyty donora s X pohlavním chromozomem. Z těchto závěrů plyne možnost další aplikace, kdy spermie nesoucí chromozom X mohou být vhodný nástroj pro produkci celosamičích populací bez nutnosti

provádění hormonálních zvrátů. Alternativně mohou být spermie produkované původně z transplantovaných oocyt zmrazeny a v případě potřeby použity pro oplodnění.



Obr. 9. Identifikace pozitivních chimér zárodečné linie pomocí molekulární analýzy. RT-PCR analýza gonád chimér zárodečné linie pomocí druhově specifických primerů pro sekvenci *dnd* genu kapra obecného, včetně kontrolních vzorků. Přítomnost ampliconu potvrzuje expresi kapřího *dnd* genu, který indikuje aktivitu transplantovaných zárodečných buněk v gonádě recipientů. Chiméry – gonády jedinců karase zlatého po transplantaci zárodečných buněk kapra. Kapr ♂ – vzorek testikulární tkáně kapra, ♀ – vzorek tkáně ovarií, P – vzorek ploutve. Karas ♂ – vzorek testikulární tkáně, ♀ – vzorek tkáně ovarií, *dnd* MO – gonáda sterilního recipienta, P – vzorek ploutve. Převzato a upraveno podle Fraňka a kol. (2019b).

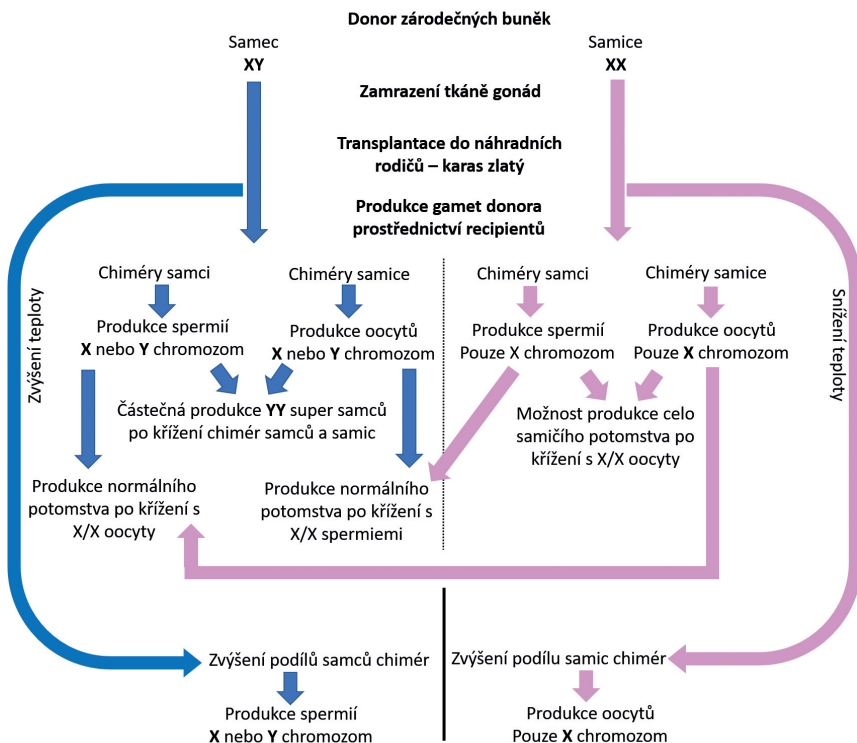
ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO
(*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI
DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE



Obr. 10. Vývoj chimérických gonád v tělech recipientů 3 měsíce po transplantaci. A – kontrolní jedinec, A' – samice s oboustranně vyvinutými ovárii. B – recipient sterilizovaný pomocí blokování translace dead end genu, kdy se v gonádách nenacházejí žádné zárodečné buňky. C – recipient transplantovaný spermatogoniemi, gonáda vpravo je kolonizována a vyvíjí se v testes, gonáda vlevo není kolonizována. D – recipient transplantovaný spermatogoniemi vyvíjejících se fenotypově v samici, rané oocyty jsou patrné na snímku vyjmutých ovárií. Převzato a upraveno podle Fraňka a kol. (2019a).

V případě snahy minimalizovat produkci spermií nesoucí pouze X chromozomy a stejně tak oocytů nesoucí pouze Y chromozomy je možné aplikovat řízení teploty, ve které jsou odchovávány larvy karase. Zvýšení teploty k 30 °C má za následek maskulinizaci, a naopak snížení na 15–20 °C feminizaci (Goto-Kazeto a kol., 2006). Tudíž je v případě potřeby možné uvažovat, že pro účely obnovení genetických rezerv budou larvy karase po transplantaci spermatogonií drženy na vysoké teplotě, a naopak ryby transplantované

oogoniemi budou drženy na nižší teplotě. Tímto postupem dojde k zefektivnění produkce gamet pomocí náhradních rodičů. Vybrané možnosti aplikace technologií manipulací zárodečných buněk kapra jsou znázorněny v Obr. 11.



Obr. 11. Schéma využití manipulací se zárodečnými buňkami kapra za účelem náhradní reprodukce a možností dalších aplikací pro manipulaci pohlaví potomstva.

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Tato metodika poskytuje přehled o možnostech aplikace moderních biotechnologických metod u kapra obecného s potenciálem pro zefektivnění držení genetických zdrojů. V současné době jsou technologie manipulací zárodečných buněk aplikovány u několika druhů ryb, kdy se výzkumné týmy soustředí především na vývoj protokolů pro zmrazování a identifikaci optimálních náhradních rodičů. Prezentovaná metodika shrnuje několikaletou práci autorského kolektivu, při které byly poprvé zmrazeny spermatogonie a oogonie kapra obecného, kdy jejich fyziologická aktivita byla ověřena

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

transplantací do náhradních rodičů a následnou úspěšnou produkcí gamet dárce. Významnou novostí metodiky je možnost uchování samičích genetických zdrojů prostřednictvím zmrazování diploidních kmenových oogonií.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Kapr obecný je od roku 1996 zařazen do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství. Podle zákona č. 154/2000 Sb., ve znění dalších předpisů (plemenářského zákona), zárodečné kmenové buňky splňují definici genetického živočišného zdroje, kterým mohou být jedinci, gamety, embrya a další materiál. Pro tyto účely lze chápat prezentovanou metodiku jako alternativní/doplňkový postup pro tradiční zmrazování spermatu kapra pro účely záchovy genofondu popsané v technologii Rodina a kol. (2010).

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Samotný postup a potřebné vybavení pro zmrazování tkáně gonád byl vyvinut především s ohledem na snadnou proveditelnost a minimalizaci nákladů. Jako ideální kompromis lze navrhnout spolupráci rybářského subjektu s institucí, která je vybavena pro uchování biologického materiálu v tekutém dusíku. Samotný odběr tkáně gonád je prováděn s pomocí základních chirurgických nástrojů. Po odběru gonád je možné tkáň bezpečně uchovat a transportovat na pracoviště, kde bude provedeno zmrazení. Pro zmrazování v místě odběru gonád je nutné se vybavit chemikáliemi v řádu stovek korun a kryozkumavkami (korunové položky). V případě disponování mrazicí krabičkou s kontrolovanou rychlostí mrazení (cena 2–5 tis. Kč) je možné zmrazení provést v provozních podmínkách v polystyrénovém boxu, který je vyplněný suchým ledem a následně biologický materiál uložit na specializovaném pracovišti. Ve výsledku lze odhadnout, že vybavení základními nástroji, materiálem a chemikáliemi umožňující zmrazení vzorků na -80 °C nebude převyšovat 5–10 tis. Kč i s předpokladem opakovaného využití. Po zakoupení potřebného vybavení je jedinou nutnou položkou zakoupení suchého ledu. Je zřejmé, že výše zmíněný návrh technologie je vhodný pro minimalizaci nákladů a zpřístupnění technologie pro praxi. Samozřejmě existují i nákladnější varianty, především co se týče technologie mrazení do -80 °C, které může být provedeno v hlubokomrazicím boxu (statisíce Kč), případně ve speciálním zařízení s programovatelnou rychlostí mrazení (stovky tisíc Kč), nicméně použití násobně dražších technologií nemá vliv na kvalitu výstupu tohoto procesu – uchování buněk v životaschopném stavu. Závěrem k ekonomickým aspektům zmrazování lze tvrdit, že náklady na zmrazení tkáně gonád z jedné ryby budou

v řádu korun (pokud není bráno v potaz nutnost pořízení základního vybavení). Následně je nutné započítat náklady na převoz a uložení v tekutém dusíku, nicméně i v tomto případě se bude pravděpodobně jednat o korunové položky, které se nebudou významně lišit od nákladů potřebných na uchování spermatu.

Druhou kapitolou ekonomických aspektů je obnovení zmrazených zárodečných buněk transplantací do náhradních rodičů. V tomto případě se již jedná o technologii náročnou nejen na vybavení, ale i personál. Ve zkratce lze zmínit nutnost mikroskopu, injektoru, manipulátoru, centrifugy, které jsou nutné pro samotné provedení transplantace, ale také další laboratorní přístroje jako třepačka a inkubátor. Dále je nutné zohlednit náklady na chemikálie potřebné pro sterilizaci recipientů a přípravu suspenze buněk. V součtu se jedná o částku, která převyšuje 100 tis. Kč.

Technologii zárodečných buněk nelze chápat jako plnohodnotnou alternativu k držení genových zdrojů *in situ*. Presentovaný postup nakládání se zárodečnými buňkami kapra je třeba chápat jako komplementární ke standardním metodám uchování genetických zdrojů. Je nutné zmínit, že prezentované postupy prokázaly možnost úspěšného mrazení genetických zdrojů a získání gamet z transplantovaných samičích zárodečných buněk, čehož v případě ryb není možné dosáhnout jiným způsobem. Lze tedy mluvit o přínosu v řádu statisíců korun, který může nabývat mimořádného významu za situace, kdy bude živý genofond daného plemene ztracen. Využití zmrazeného spermatu pro krizový scénář ztráty živého genofundu by znamenalo nutnost alespoň částečné obnovy plemene po několik generací. Naproti tomu produkce gamet kapra prostřednictvím zlatých karasů je možná v horizontu 2–3 let, což by v důsledku znamenalo mnohonásobně nižší náklady na obnovu genofundu.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Avarbock, M.R., Brinster, C.J., Brinster, R.L., 1996. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Medicine* 2: 693–6.
- Bakos, J., Gorda, S., Haltenyészteszi Kutató Intézet., Food and Agriculture Organization of the United Nations., 2001. Genetic resources of common carp at the Fish Culture Research Institute, Szarvas, Hungary. FAO, Rome, Italy, 111 pp.
- Baloch, A.R., Franěk, R., Tichopád, T., Fučíková, M., Rodina, M., Pšenička, M., Baloch, A.R., Franěk, R., Tichopád, T., Fučíková, M., Rodina, M., Pšenička, M., 2019. Dnd1 knockout in sturgeons by CRISPR/Cas9 generates germ cell free host for surrogate production. *Animals* 9: 174.
- Balon, E.K., 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture* 129: 3–48.

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

- Bar, I., Smith, A., Bubner, E., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Yazawa, R., Chen, B.N., Cummins, S., Elizur, A., 2016. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 2051.
- Braat, A., Speksnijder, J.E., Zivkovic, D., 1999. Germ line development in fishes. *The International Journal of Developmental Biology* 43: 745–760.
- 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: 11298–11302.
- Crooijmans, R.P.M.A., Bierbooms, V.A.F., Komen, J., Van der Poel, J.J., Goenen, M.A.M., 1997. Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics* 21: 129–134.
- FAO, 2016. The state of world fisheries and aquaculture, Contributing to food security and nutrition for all. FAO, Rome, Italy 200 pp.
- Flajšhans, M., Linhart, O., Šechta, V., 1999. Genetic resources of commercially important fish species in the Czech Republic: present state and future strategy. *Aquaculture* 173: 471–483.
- Franěk, R., Marinović, Z., Lujčić, J., Urbányi, B., Fučíková, M., Kašpar, V., Pšenička, M., Horváth, Á., 2019a. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. *PLOS ONE* 14: e0205481.
- Franěk, R., Tichopád, T., Steinbach, C., Xie, X., Lujčić, J., Marinović, Z., Horváth, Á., Kašpar, V., Pšenička, M., Lujčić, J., Horváth, Á., Pšenička, M., 2019b. Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation. *Cryobiology* 87: 78–85.
- Gorda, S., Bakos, J., Liska, J., Kakuk, C., 1995. Live gene bank of common carp strains at the Fish Culture Research Institute, Szarvas. *Aquaculture* 129: 199–202.
- Goto-Kazeto, R., Abe, Y., Masai, K., Yamaha, E., Adachi, S., Yamauchi, K., 2006. Temperature-dependent sex differentiation in goldfish: Establishing the temperature-sensitive period and effect of constant and fluctuating water temperatures. *Aquaculture* 254: 617–624.
- Hamasaki, M., Takeuchi, Y., Yazawa, R., Yoshikawa, S., Kadomura, K., Yamada, T., Miyaki, K., Kikuchi, K., Yoshizaki, G., 2017. Production of Tiger Puffer *Takifugu rubripes* Offspring from Triploid Grass Puffer *Takifugu niphobles* Parents. *Marine Biotechnology* 19: 579–591.
- Higaki, S., Todo, T., Teshima, R., Tooyama, I., Fujioka, Y., Sakai, N., Takada, T., 2018. Cryopreservation of male and female gonial cells by vitrification in the critically endangered cyprinid honmoroko *Gnathopogon caeruleus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 44: 503–513.
- Horváth, Á., Miskolczi, E., Mihálffy, S., Osz, K., Szabó, K., Urbányi, B., 2007. Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1.2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology* 54: 251–257.

- Hulák, M., Kaspar, V., Kohlmann, K., Coward, K., Tešitel, J., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Linhart, O., 2010. Microsatellite-based genetic diversity and differentiation of foreign common carp (*Cyprinus carpio*) strains farmed in the Czech Republic. *Aquaculture* 298: 194–201.
- Kohlmann, K., Kersten, P., Flajšhans, M., 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture* 247: 253–266.
- Lacerda, S.M.S.N., Costa, G.M.J., Campos-Junior, P.H.A., Segatelli, T.M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., França, L.R., 2013. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiology and Biochemistry* 39: 3–11.
- Lee, S., Yoshizaki, G., 2016. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology* 72: 165–168.
- Lee, S., Iwasaki, Y., Shikina, S., Yoshizaki, G., 2013. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 1640–1645.
- Lee, S., Seki, S., Katayama, N., Yoshizaki, G., 2015. Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. *Scientific Reports* 5: 16045.
- Lee, S., Iwasaki, Y., Yoshizaki, G., 2016a. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. *Cryobiology* 73: 5–9.
- Lee, S., Katayama, N., Yoshizaki, G., 2016b. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478: 1478–1483.
- Linhart, O., Rodina, M., Cosson, J., 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 41: 241–250.
- Linhartová, Z., Rodina, M., Guralp, H., Gazo, I., Saito, T., Pšenička, M., 2014. Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). *Czech Journal of Animal Science* 59: 381–390.
- Linhartová, Z., Saito, T., Kašpar, V., Rodina, M., Prášková, E., Hagihara, S., Pšenička, M., 2015. Sterilization of sterlet *Acipenser ruthenus* by using knockdown agent, antisense morpholino oligonucleotide, against dead end gene. *Theriogenology* 84: 1246–1255.
- Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F., Feigin, P., 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks – Strategies in research and application. *Aquaculture* 155: 13–30.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165: 367–389.
- Lujić, J., Marinović, Z., Sušnik Bajec, S., Djurdjevič, I., Kása, E., Urbányi, B., Horváth, Á., 2017. First successful vitrification of salmonid ovarian tissue. *Cryobiology* 76: 154–157.

ZMRAZOVÁNÍ ZÁRODEČNÝCH BUNĚK KAPRA OBECNÉHO (*CYPRINUS CARPIO*) A JEJICH VYUŽITÍ K TRANSPLANTACI DO NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY REPRODUKCE

- Marinović, Z., Lujčić, J., Kása, E., Bernáth, G., Urbányi, B., Horváth, Á., 2016. Cryosurvival of isolated testicular cells and testicular tissue of tench *Tinca tinca* and goldfish *Carassius auratus* following slow-rate freezing. *General and Comparative Endocrinology* 245: 77–83.
- Marinović, Z., Lujčić, J., Kása, E., Csenki, Z., Urbányi, B., Horváth, Á., 2018. Cryopreservation of zebrafish spermatogonia by whole testes needle immersed ultra-rapid cooling. *Journal of Visualized Experiments* 133: e56118.
- Mazur, P., 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of General Physiology* 47: 347–369.
- Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology* 247: 125–142.
- 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: 2725–2729.
- Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 317: 15–17.
- Pradhan, A., Olsson, P.-E., 2014. Juvenile ovary to testis transition in zebrafish involves inhibition of Ptges1. *Biology of Reproduction* 91: 1–15.
- Pšenička, M., Saito, T., Rodina, M., Dzyuba, B., 2016. Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells. *Cryobiology* 72: 199–222.
- Rodina, M., Dzyuba, B., Boryshúpolets, S., Linhart, O., 2010. Zmrazování spermatu kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) pro potřeby uchování genofondu v praktických podmínkách. *Edice Metodik, FROV JU*, č. 102, 25 s.
- Schulz, R.W., Renato, L., França, D., Lareyre, J., Legac, F., Chiarini-Garcia, H., Henrique, R., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 390–411.
- Seki, S., Kusano, K., Lee, S., Iwasaki, Y., Yagisawa, M., Ishida, M., Hiratsuka, T., Sasado, T., Naruse, K., Yoshizaki, G., 2017. Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation. *Scientific Reports* 7: 43185.
- Strüssmann, C.A., Nakamura, M., 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 13–29.
- Xu, P., Zhang, X., Wang, X., Li, J., Liu, G., Kuang, Y., Xu, J., Zheng, X., Ren, L., Wang, G., Zhang, Y., Huo, L., Zhao, Z., Cao, D., Lu, C., Li, C., Zhou, Y., Liu, Z., Fan, Z., Shan, G., Li, X., Wu, S., Song, Lipu, Hou, G., Jiang, Y., Jeney, Z., Yu, D., Wang, L., Shao, C., Song, Lai, Sun, J., Ji, P., Wang, Jian, Li, Q., Xu, L., Sun, F., Feng, J., Wang, C., Wang, S., Wang, B., Li, Y., Zhu, Y., Xue, W., Zhao, L., Wang, Jintu, Gu, Y., Lv, W., Wu, K., Xiao, J., Wu, J., Zhang, Z., Yu, J., Sun, X., 2014. Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature Publishing Group* 46: 1212–1219.
- Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Ishida, M., Yoshizaki, G., 2013. The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) dead end gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia. *Molecular Reproduction and Development* 80: 871–880.

- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., Ihara, S., Takeuchi, T., 2002. Primordial germ cells: The blueprint for a piscine life. *Fish Physiology and Biochemistry* 26: 3–12.
- Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Miwa, M., Shikina, S., Okutsu, T., 2010. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development* 137: 1227–1230.
- Sbírka zákonů ČR, 2006, částka 106. Zákon č. 344/2006 Sb., Úplné znění zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), jak vyplývá z pozdějších změn. Tiskárna MV, Praha.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Franěk, R., Marinović, Z., Lujic, J., Urbányi, B., Fučíková, M., Kašpar, V., Pšenička, M., Horváth, Á., 2019. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. *PLoS ONE* 14: e0205481.
- Franěk, R., Tichopád, T., Steinbach, C., Xie, X., Lujic, J., Marinović, Z., Horváth, Á., Kašpar, V., Pšenička, M., 2019. Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation. *Cryobiology* 87: 78–85.

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumných projektů za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky – projekty CENAKVA (LM2018099) a Biodiverzita (Reprodukční genetické postupy pro uchování biodiverzity ryb a akvakulturu) (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/00073 70) – 50%, Národní agentury pro zemědělský výzkum QK1910428 Uchovávání genetických zdrojů kapra obecného *in vitro* a tvorba isogenních linií pomocí transplantace zárodečných buněk – 50%.

Externí odborný oponent

prof. Ing. Lukáš Kalous, Ph.D.

Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 16500 Praha 6 – Suchbát

Interní odborný oponent

Ing. Marek Rodina, Ph.D.

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

Oponent za státní správu

Ing. Lukáš Mareš, Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti
a rybářství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. 61388/2019-MZE-I 6232 vydalo
Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství Těšnov 65/17,
Praha 1, 110 00

Adresa autorského kolektivu

Ing. Roman Franěk, Ph.D. – 65 %

Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D. – 15 %

doc. Ing. Martin Pšenička, Ph.D. – 20 %

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské
výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský
a hydrobiologický, Zátíší 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, Vodňany, www.frov.jcu.cz;
přidělený editor: prof. Ing. Martin Flajšhans, Dr. rer. agr.; redakce: Zuzana Dvořáková;
náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2019; vytištěna v roce 2021;
grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk.