

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD

**Postup transplantace zárodečných buněk kapra
obecného a postup odchovu a reprodukce jedinců
získaných touto transplantací pro potřeby uchování
genových zdrojů či další aplikace**

Autoři

V. Kašpar, R. Franěk a M. Pšenička

č. 196

Vodňany

ISBN 978-80-7514-145-3

Vydání a tisk publikace byly uskutečněny v rámci Operačního programu

Rybářství 2014–2020:

„Metodika XI“ č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/20_017/0001094

Obsahová část metodiky 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 %.

Obsah

1. CÍL METODIKY	4
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
3. ÚVOD	5
4. VLASTNÍ METODIKA.....	10
4.1 Reprodukce karasa – příprava náhradních rodičů	10
4.2 Odběr tkáně gonád kapra.....	12
4.3 Disociace gonád kapra.....	16
4.4 Transplantace zárodečných buněk.....	17
4.5 Odchov jedinců po transplantaci.....	20
4.6 Sledování vývoje gonády	21
4.7 Histologické vyšetření	22
4.8 Reprodukce chimér	24
4.9 Určení druhové příslušnosti	33
4.10 Celkové shrnutí výsledků	35
5. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	36
6. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	36
7. EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	37
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	38
9. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	40

1. CÍL METODIKY

Cílem této metodiky je popsat postup nakládání se zárodečnými buňkami, postup transplantace zárodečných buněk, postup odchovu a reprodukce jedinců karasa po transplantaci zárodečných buněk a efektivitu reprodukce těchto jedinců (chimér) jako alternativní přístup doposud používaných metod uchovávání genových zdrojů kapra, zejména společně s kryokonzervací zárodečných buněk, která byla už v minulosti u tohoto druhu popsána.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Metodika popisuje základní postup transplantace zárodečných buněk kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a postup odchovu a reprodukce jedinců karasa (*Carassius auratus*) získaných touto transplantací pro potřeby uchování genových zdrojů či další aplikace - zejména další experimentální činnost v oblasti základního či aplikovaného výzkumu. Detailně je popsána metoda, jak pomocí techniky tzv. "náhradního rodičovství" získat gamety, resp. populaci kapra na základě transplantace zárodečných kmenových buněk do sterilizovaných jedinců karasa a reprodukce těchto jedinců. V rámci metodiky je kladen důraz na detailní popis všech dílčích kroků transplantace a předání zkušeností získaných v rámci realizace celé řady experimentů. Metodika popisuje detailním způsobem samotný postup transplantace a také zkušenosti získané v rámci reprodukce vzniklých chimér nebo tzv. "náhradních rodičů" – jedinců, kterým byly do těla vloženy zárodečné buňky jiného jedince.

Zvládnutím všech dílčích kroků je možné efektivním způsobem produkovat jedince nesoucí genetický materiál dárce, minimalizovat ztráty v průběhu odchovu raných stádií i dalšího odchovu a následně reprodukcí náhradních rodičů získat jedince původního druhu.

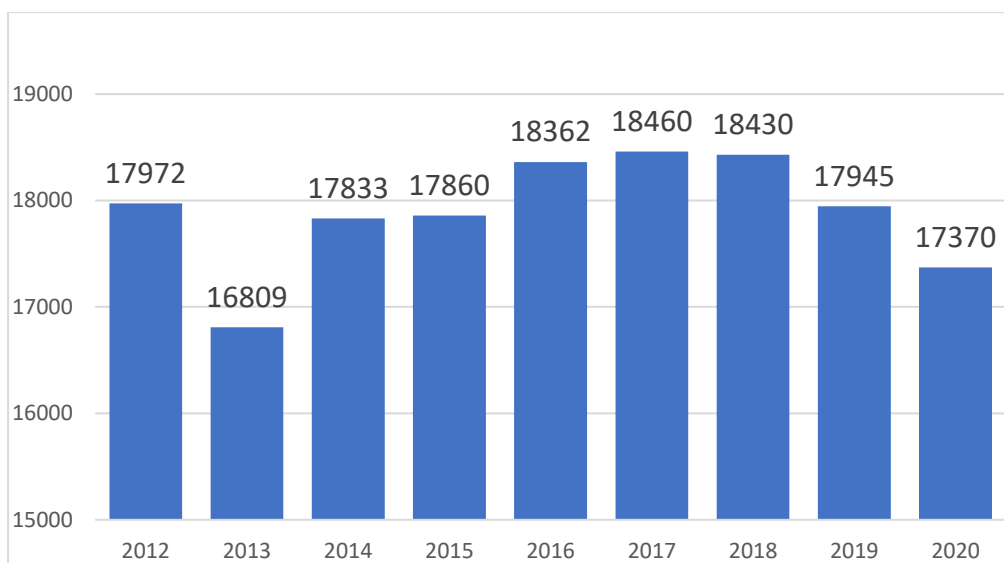
Metodika důkladně popisuje veškeré dílčí kroky tak, aby bylo možné námi optimalizovaný postup efektivně aplikovat. Zároveň jsou popsány dosavadní zkušenosti a dosahované výsledky při aplikaci popisovaných technik. Ty jsou dokumentovány pomocí celé řady metod (sledování pomocí fluorescenční mikroskopie, disekce a histologického vyšetření, skenovací elektronové mikroskopie a PCR metod). Vedle významu pro základní a aplikovaný výzkum má uvedený postup transplantace zárodečných buněk potenciál rozšířit metody uchovávání genových zdrojů *in vitro*.

Postupy uváděné v této metodice můžeme v krátkosti sumarizovat takto:

Po usmrcení jedince kapra a dezinfekci těla je s maximálním zřetelem na neporušení zažívací traktu otevřena tělní dutina a celá gonáda je odebrána asepticky. Tkáň gonád obsahující zárodečné kmenové buňky je rozdělena na menší fragmenty, které jsou poté podrobeny enzymatické disociaci na suspenzi buněk. Suspenze zárodečných kmenových buněk (spermatogonií) je pak mikroinjekcí vpravována do sedmidenních larev karasa, které vznikly z embryí sterilizovaných pomocí techniky genového knock-downu. Juvenilní karasi jsou následně odchováni až do dosažení pohlavní dospělosti, sledován je vývoj gonád. Karasi ve věku 28 nebo 36 měsíců jsou pak reprodukováni a vzájemným křížením těchto jedinců je získávána populace kapra odpovídající původu donora zárodečných buněk.

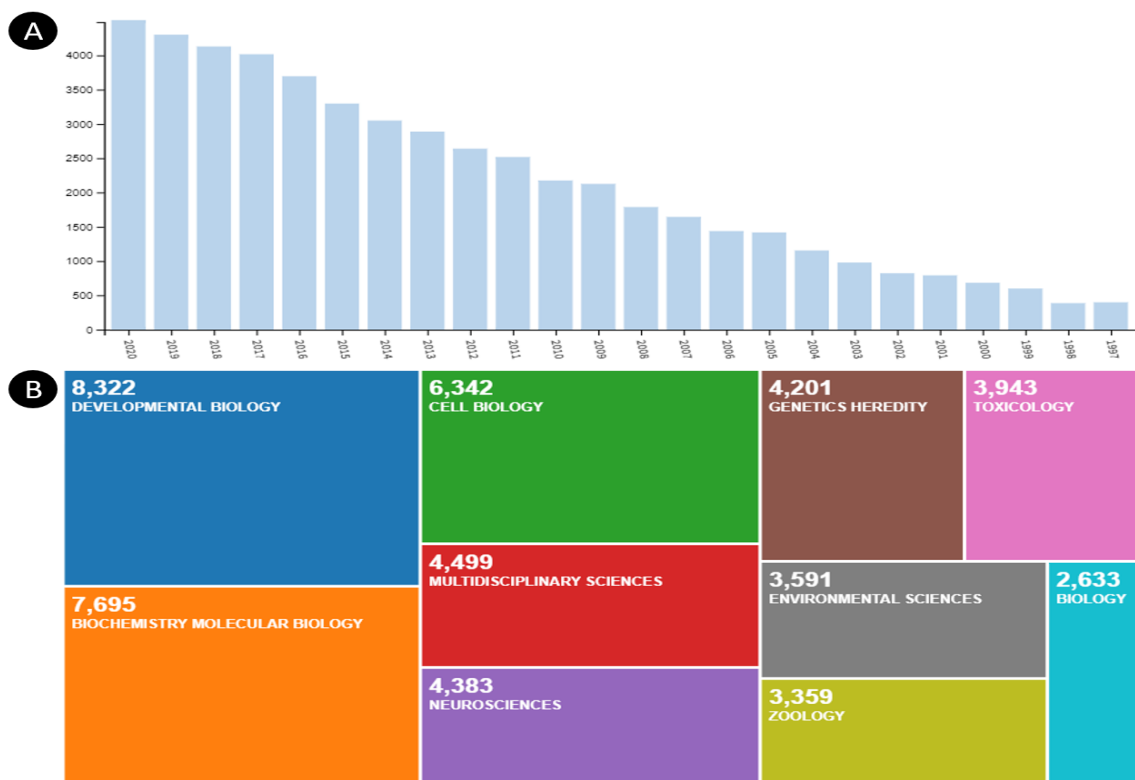
3.ÚVOD

Kapr obecný patří mezi nejstarší domestikované druhy ryb na světě (Balon, 1995) a současná celosvětová roční produkce tohoto druhu v akvakultuře dosahuje úrovně více než 4 miliony tun (FAO, 2019). Tato skutečnost řadí kapra mezi nejvýznamnější akvakulturně produkované druhy ryb. Podle dostupných statistik Rybářského sdružení ČR produkce kapra v České republice v poslední dekádě vykazovala úrovně 16 809 – 18 460 t (Graf 1).



Graf 1. Produkce kapra obecného v ČR v období 2012 – 2020 (data Rybářského sdružení ČR).

Vedle produkčního významu má tento druh i význam pro výzkum. Vysoká popularita kapra v oblasti základního a aplikovaného výzkumu (Obr. 1) je zapříčiněna jeho snadnou dostupností, vysokou plodností, externím oplozením, relativně rychlým vývojem, snadným odchovem v kontrolovaných podmínkách i prostředí rybníční akvakultury. Genom kapra byl publikován v roce 2014 (Xu a kol., 2014) a i dostupnost genomu kapra umožnila další rozšíření kapra jako modelového druhu.



Obr. 1.: Význam a popularita kapra obecného v základním i aplikovaném výzkumu. A) Graf znázorňuje roční počty publikací – klíčové slovo “common carp” v databázi Web of Science mezi léty 2020 a 1997. B) Deset vědních oborů s největším počtem publikací na kapra obecného.

Dlouhý proces domestikace napříč Evropou a Asií, vysoká úroveň produkce, popularita tohoto druhu a šlechtitelská práce vyústily v existenci celé řady plemen a linií využívaných v rybníční akvakultuře. Přehled plemen a linií chovaných v ČR uvádí Pokorný a kol. (1996). Mimořádný význam jednotlivých plemen tohoto druhu vedl k vytvoření metod pro uchování genových zdrojů zahrnující odchov generačního hejna (Flajšhans a kol., 1999), metod ke studiu jejich genetické variability (Crooijmans a kol., 2005; Kohlmann a kol., 2005; Hulák a kol., 2010; Xu a kol., 2014) a vedl i k vytvoření postupů pro uchování genových zdrojů *ex situ* prostřednictvím zmrazeného spermatu v kryobankách (Linhart a kol., 2000; Lubzens a kol., 1997; Horváth a kol., 2007). Nicméně, doposud vyvinuté a využívané strategie konzervace genových zdrojů *in vitro* nelze považovat za zcela plnohodnotné, jelikož není možné uchovat samičí zdroje *ex situ*. Z tohoto důvodu je do budoucna nutné u ryb uvažovat i nad začleněním alternativních strategií, které využívají recentní biotechnologické poznatky. Jako alternativa se nabízí využití technik transplantace zárodečných buněk a ideálně pak kombinace těchto technik s kryokonzervací zárodečných kmenových buněk (Franěk a kol., 2019a, Franěk a kol., 2019b). Pohlavně se rozmnožující organismy obsahují dvě buněčné linie – somatické buňky a buňky zárodečné. Linie zárodečných buněk je založena primordiálními gonocyty, které tvoří tzv. zárodečnou lištu, do které migrují z místa svého vzniku v průběhu ontogenetického vývoje. Primordiální gonocyty následně proliferují a zakládají gonádu – pohlavně diferencují v spermatogonie či oogonie (Braat a kol., 1999, Yoshizaki a kol., 2002). Termínem zárodečná buňka je označováno jakékoliv stádium od primordiálního gonocytu, přes spermatogonii/oogonii až po oplození schopnou spermii či oocyt. Pro účely přenosu zárodečných buněk a vytváření tzv. “náhradních rodičů” nebo také “chimér zárodečných linií” (případně i v kombinaci s kryokonzervací) jsou cílem buňky zachovávající kmenovost - tj.

embryonální primordiální gonocyty nebo spermatogoniální či oogoniální kmenové buňky. Spermatogoniální zárodečné buňky jsou schopny na základě mitotického dělení produkovat dceřiné buňky – spermatogonie typu A, diferenciovat se ve spermatogonie typu B a následně produkovat spermatocyty, spermatidy a spermie (Schulz a kol., 2010). Ogonie jsou pak schopny proliferovat v premeiotické oocyty a projít vitelogenezí a vytvořit funkční oocyt. Jako transdiferenciace se pak označuje skutečnost, kdy zárodečné buňky diferencují v gonádu opačného pohlaví.

Transplantace spermatogonií byla poprvé prováděna u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a transplantované spermatogonie kolonizovaly zárodečnou rýhu příjemců, byly schopny diferenciace ve funkční spermie ale i transdiferenciovat v oocyty (Okutsu a kol., 2006, a 2007). Schopnost transdiferenciace u stejného druhu byla sledována i později, kdy transplantované oogonie úspěšně proliferovaly po transplantaci do recipientů samčího pohlaví v spermatocyty a produkovaly spermie, které ale nesly DNA (včetně pohlavní chromozomů) samice (Yoshizaki a kol., 2010). Produkce životaschopných gamet byla dosažena v případě mezidruhově transplantace zárodečných buněk karasa obecného (*Carassius carassius*) a karasa zlatého (*Carassius auratus*) (Yamaha a kol., 2001), transplantace mezi pstruhem duhovým (*Oncorhynchus mykiss*) a lososem masu (*Oncorhynchus masou*) (Okutsu a kol., 2007) nebo dvěma druhy čtverzubců (čtverzubec rudoploutvý *Takifugu rubripes* a *Takifugu niphobles*) (Hamasaki a kol., 2017).

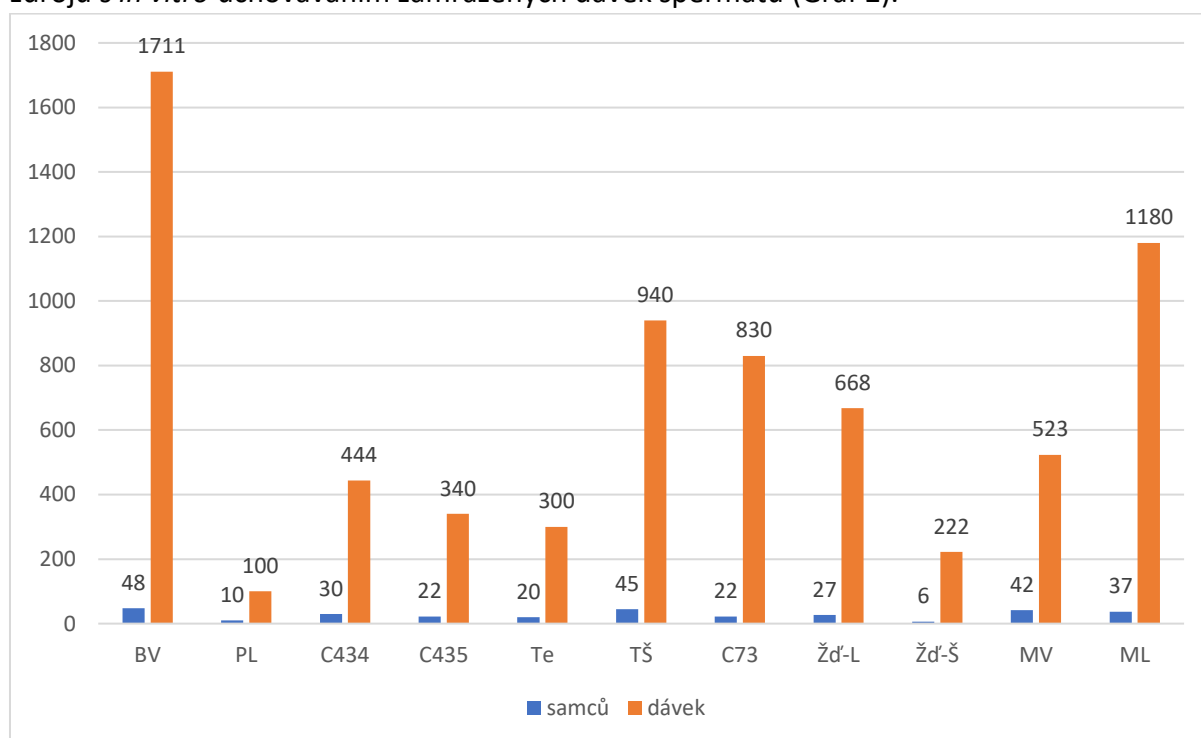
Plné využití technik transplantace zárodečných kmenových buněk pro uchování genových zdrojů je možné až po úspěšném zvládnutí a optimalizaci postupů kryokonzervace, ověření efektivity všech dílčích metod a dokonalém zvládnutí odchovu náhradních rodičů v kontrolovaném prostředí.

U kapra obecného byly nedávno vyvinuty a popsány techniky kryokonzervace samčích (Franěk a kol., 2019a) i samičích (Franěk a kol., 2019b) zárodečných buněk – resp. tkáně gonád obsahující zárodečné buňky. Byla sledována i proliferace buněk izolovaných z kryokonzervované tkáně gonád po transplantaci do sterilních jedinců karasa. Tato metodika navazuje na realizované experimenty a popisuje transplantaci zárodečných buněk do juvenilních jedinců karasa a zkušenosti s odchovem a reprodukcí takto získaných jedinců. Optimalizace všech postupů transplantace 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 uchováním cenných experimentálních linií. Vývoj a následné zahrnutí technologií transferu zárodečných kmenových buněk ryb do programů uchování genetických zdrojů může znatelně snížit riziko ztráty vzácných linií či druhů v důsledku samotného výskytu či následné eradikace virových nákaz, přírodních katastrof, ale i nepředvídatelného selhání chovatelských technologií. Vytváření chimér a těchto náhradních rodičů druhu menšího tělesného rámce lze navíc chápat jako účinnou metodu pro redukci prostoru nutného pro držení živých genetických rezerv nebo experimentálních linií.

Kapr obecný je do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství zařazen od roku 1996. Podle zák. 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. Genové zdroje ryb v akvakulturách jsou stabilizovány, udržovány formou kmenových hejn *in situ*, zvládnutá je i kryokonzervace a uchovávání zamrazeného spermatu *in vitro*. Ministerstvo zemědělství České republiky vyhlásilo Národní program

konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství na období 2018–2022 a aktuálně běžící Národní program přímo navazuje na dvacet let úspěšně trvající programy ochrany genetických zdrojů pro výživu a zemědělství. V minulosti mezi priority Národního programu patřily aktivity zaměřené především na evidenci a bezpečnou konzervaci genetických zdrojů, identifikaci a eliminaci duplicit a racionalizaci práce s genetickými zdroji. Současný Národní program se zaměřuje na vzrůstající potřebu hodnocení a charakterizace genetických zdrojů, poznání genetické diverzity a identifikaci zvláště cenných genotypů, zejména jako donorů různých znaků resistance.

Genové zdroje ryb jsou chovány *in situ* formou permanentně obnovovaných kmenových hejn o velikosti 120 jedinců, každý druh ve dvou, maximálně třech kmenových hejnech. Obnova kmenových hejn se provádí výhradně umělým výtěrem při specifických technicko-chovatelských opatřeních, např. inkubaci jiker ve fyzicky odděleném systému nebo v jiném časovém období, než jsou inkubovány jikry určené k produkci tržních ryb (Flajšhans a kol., 2009). Vedle uchovávání genových zdrojů *in situ* počítá národní program uchovávání genových zdrojů s *in vitro* uchováváním zamražených dávek spermatu (Graf 2).



Graf 2:. Počty samců a dávek zamraženého spermatu v genové bance (BV – Jihočeský kapr šupinatý, PL – Pohořelický lysec, C434 a C435 – syntetické linie, Te – Telčský lysec, TŠ – Třeboňský šupináč, C73 – Jihočeský kapr šupinatý, Žď-L – Žďárský lysec, Žď-Š – Žďárský šupináč, MV – Milevský lysec, ML – Mariánskolázeňský kapr šupinatý).

Genové zdroje ryb patří mezi kulturní dědictví, plemena začleněná mezi genové zdroje jsou však neustále využívána k produkci ryb k tržním účelům a významným způsobem se podílí na celkové produkci akvakultury v České republice a představují významný zdroj pro další šlechtitelskou práci. Původní plemena kapra začleněná mezi genové zdroje byla však v minulosti využita i pro vznik novošlechtěnců – například Amurského lysce.

Nakládání s genovými zdroji se řídí následující legislativou:

Zákon č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), ve znění pozdějších předpisů

Zákon č. 148/2003 Sb., o konzervaci a využívání genetických zdrojů rostlin a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství a o změně zákona č. 368/1992 Sb., o správních poplatcích, ve znění pozdějších předpisů (zákon o genetických zdrojích rostlin a mikroorganismů).

Vyhláška č. 72/2017 Sb., o genetických zdrojích zvířat.

Vyhláška č. 458/2003 Sb., kterou se provádí zákon o genetických zdrojích rostlin a mikroorganismů, ve znění vyhlášky č. 2013/2017 Sb.

4. VLASTNÍ METODIKA

4.1 Reprodukce karasa – příprava náhradních rodičů

Pro získání vhodné populace náhradních rodičů je nutné získat sterilní jedince karasa (*Carassius auratus*). Nejvhodnějším způsobem získání sterilních jedinců je sterilizace pomocí genového knock-downu pomocí tzv. morpholino oligonukleotidu mikroinjekcí vpravovaného do oplozených jiker. V takovém případě je do jiker po oplození vpravován 100 μ M roztok antisense morpholino oligonukleotidu (MO) Gene Tools LLC (Philomath, OR, USA) (GenBank, JN578697, cílová sekvence : 5'CATCA-CAGGTGGACAGCGGCATGGA 3') v 0,2 M KCl, jak bylo popsáno dříve (Franěk a kol., 2019a). MO je chemikálie, která dočasně inhibuje translaci RNA do proteinů. Pro účely sterilizace je inhibována translace *dnd* genu, který je zásadní pro migraci primordiálních gonocytů.

Při optimalizaci této metodiky bylo generační hejno karasa (*Carassius auratus*) drženo na líhni Genetického rybářského centra v kontrolovaných podmínkách a reprodukce byla indukována hormonální stimulací suspenzí kapří hypofýzy podle standardních metod - stejně tak jako v případě předchozích experimentů zaměřených na kryokonzervaci zárodečných buněk (Franěk et al., 2019a, Franěk et al., 2019b). Reprodukce generačních ryb probíhala v květnu, což odpovídá normálním podmínkám rozmnožování většiny kaprovitých ryb. Generační ryby byly získány nákupem od místního chovatele a byly drženy ve žlabu a kapacitě 1000 l s recirkulací, filtrací a kontrolou teploty. Generační ryby je vhodné reprodukovat v sezoně přirozené reprodukce, v případě mimosezonního výtěru je nutné fotoperiodu a teplotu upravit odpovídajícím způsobem. V našem případě byla reprodukce plánována na začátek sezony přirozené reprodukce a přibližně týden před plánovaným výtěrem byla teplota vody denně zvyšována přibližně o 1 °C. Umělá reprodukce byla indukována při dosažení teploty vody 22 °C intraperitoneální injekcí suspenze kapří hypofýzy (0,5 a 2,5 mg na kg tělesné hmotnosti) s rozestupem 12 h mezi aplikacemi. Obě pohlaví obdržela stejnou dávku.

Ovulaci a spermiaci je nutné ověřovat 12 h po podání druhé dávky hypofýzy. Jemným tlakem na abdominální partii jsou pak získávány jikry od samic a sperma od všech samců. V rámci optimalizace této metodiky bylo sperma všech samců (n=10) odebíráno pomocí pipety a přeneseno do 1,5 ml zkumavek a skladováno do oplození na ledu. Jikry od všech samic (n=5) byly odebírány do 50 ml zkumavek a skladovány při 10 °C v laboratorním inkubátoru do doby oplození (ne více než 1 hodinu).

Pro vytvoření populace pro transplantaci zárodečných buněk je vhodné smísit těsně před oplozením jikry všech samic v suché misce (přibližně 1g gram jiker od každé samice), sperma každého ze samců pak nanést do směsi jiker, jemně zamíchat a gamety aktivovat přidáním odstáté vodovodní vody vytemperované na 22 °C. Jikry je vhodné pro lepší práci přilepit k povrchu Petriho misek. Oplozované množství jiker je třeba rozdělit na porce o velikosti 300-400 ks jiker na jednotlivé misky o průměru 9 cm a ponechat stát cca. 1 minutu, aby došlo k dostatečné adhezi k povrchu. Díky přilepení embryí k povrchu není nutné provádět enzymatické odstranění chorionu pro mikroinjikaci. Samotná mikroinjikace je prováděna s pomocí binolupy, mikroinjektoru a mikromanipulátoru na kterém je připevněna skleněná kapilára s injikovaným roztokem MO v 0,2 M KCl (Obr. 2). Po proniknutí chorionem je vpich prováděn do žloutku (vegetativní části embrya). Objem vpraveného MO je přibližně 10% z celkového objemu embrya. Mikroinjikace do animálního pólu je až na výjimečné účely

nedoporučená, jelikož může dojít k narušení procesu buněčného dělení, případně k poškození embrya. V případě meroblasticky se rýhujících embryí kostnatých ryb dochází ke značnému transportu obsahu žloutku do animálního pólu, tudíž i mikroinjikované MO je dopraveno do potřebné části embrya, kde zajistí odstranění endogenních primordiálních gonocytů.

Po mikroinjikaci je třeba embrya ponechat přibližně do stádia pokročilé blastuly (1000 buněk) v inkubátoru a následně přenést do inkubačního aparátu s recirkulací vody. V případě adheovaných embryí je tento krok naprosto zásadní pro zdárnou produkci sterilních recipientů. Při mikroinjikaci přirozeně dochází k určitému stresu a poškození embryí což má za následek snížení přežití. Skutečnost, že jsou embrya poměrně pevně spojená s podkladem značně limituje možnost odstraňování uhynulých kusů. Následné rozkladné procesy snižují obsah kyslíku, a naopak zvyšují koncentraci škodlivých látek vznikajících při rozkladu biologického materiálu. Z těchto důvodů je nutné k embryím stále přivádět okysličenou vodu, která omývá jejich povrch. Embrya by měla být ponechána do vykulení a rozplavání v experimentálním inkubátoru (Obrázek 3) s UV sterilizací recirkulované vody o teplotě 22 °C. Dalším specifickým bodem v péči o mikroinjikovaná embrya je skutečnost, že mají mírně zpomalený vývoj a ke kulení a rozplavání dochází přibližně o 12-24 hodin později než u kontrolních neošetřených jedinců. Rozplavaný váčkový plůdek je po vykulení možné opatrně převést do plastových nádob a držet v laboratorním inkubátoru kde je rozkrmán žábřonožkami (*Artemia* spp.).



Obr. 2.: Doporučený tvar mikrokapilár pro injikaci embryí. Při vytahování skleněných kapilár je důležité optimalizovat nastavení (teplota a váha závaží) na zařízení pro vytahování kapilár tak, aby bylo dosaženo co nejmenšího průměru špičky (Foto: R. Franěk).



Obr. 3.: Experimentální inkubátor s recirkulovanou vodou ošetřenou UV zářením pro inkubaci jiker karasa po mikroinjekci nebo inkubace jiker z experimentálních oplození (Foto: V. Kašpar).

4.2 Odběr tkáně gonád kapra

Samotný odběr gonád a příprava buněčné suspenze pro transplantaci je obvykle prováděna ve stejný den jako transplantace samotná. Pro účely získání zárodečných buněk je vhodné selektované jedince držet několik dnů před samotným odběrem v kontrolovaných podmínkách a bez krmení, čímž dojde k vyláčení, sníží se naplněnost střev a tím pádem i riziko jejich protržení v průběhu disekce gonád, což by jinak zapříčinilo silnou kontaminace tělní dutiny bakteriemi ze zažívacího traktu. V případě transplantace kontaminované suspenze dochází ke značnému snížení přežití po transplantaci, často i k totální mortalitě. V případě zjištěné kontaminace je tedy jediným možným postupem opakovat odebrání tkáně gonád z jiného jedince. Použití širokospektrálních antibiotik pouze dočasně utlumí aktivu bakterií.

Před samotným odběrem gonád je důležité zvážit vhodnou velikost a věk daného jedince a ověřit stupeň vývoje gonád disekcí několika jedinců ze skupiny. Obecně jsou vhodnější juvenilní ryby, v případě kapra jedinci o věku 1-2 roky s váhou do 100 g. I u takto starých jedinců však je možné narazit na gonády v pozdějším stádiu vývoje a u samců lze pozorovat jedince přirozeně produkující sperma a to i v případě ryb odchovávaných v běžném rybníčním prostředí. Vhodnost ranějších stádií vývoje gonád pro transplantaci je dána skutečností, že pouze zárodečné kmenové buňky jsou schopny kolonizovat gonádu příjemce. Tudíž ostatní meiotické zárodečné buňky v důsledku způsobují naředění buněčné suspenze a tím snižují relativní podíl buněk s kmenovým potenciálem. Avšak účinným řešením je obohacení suspenze kmenových buněk prostřednictvím denzitního gradientu, které je popsáno níže. Pro

samotnou transplantaci je možné použít samce i samice, je však nutné mít na paměti, že v případě heterogametického dárce (XY) a následném křížení dochází k produkci tzv. supersamců (YY). Naopak v případě použití homogametického dárce (XX) a následném křížení vzniká celosamičí populace.

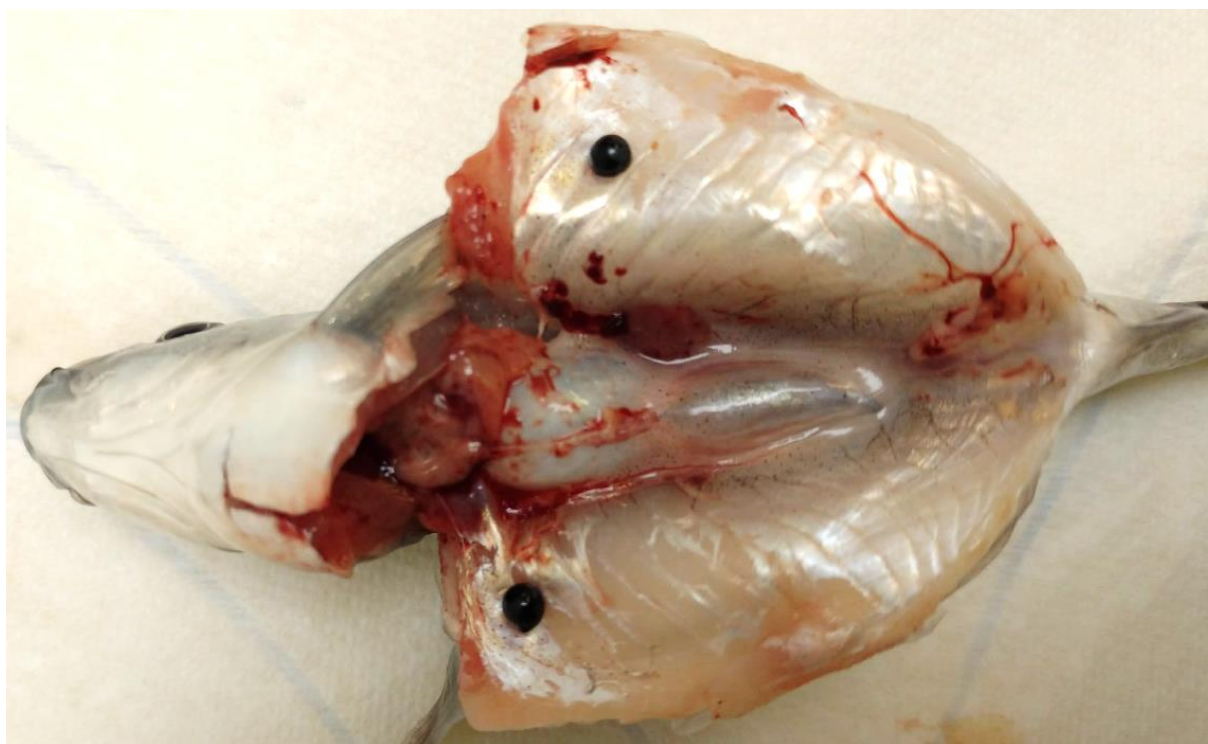
Jako donor zárodečných buněk byl pro naši experimentální práci použit 2 roky starý samec kapra obecného (*Cyprinus carpio*), který byl odchováván v experimentálních podmínkách v akvarijním systému Genetického rybářského centra Fakulty rybářství a ochrany vod. Donor o váze 425g (Obr. 4) byl usmrčen – nejprve vystaven nadměrné dávce anestetika (400 mg.l⁻¹) (MS222, Sigma-Aldrich) a následně důkladně vykvrven.

Tělo ryby je před samotnou disekcí nutné řádně dezinfikovat 70% roztokem etanolu. V případě větších jedinců je možné dezinfekci provést politím/postřikem těla ryby, v případě menších jedinců je ideální krátkodobé ponoření do etanolu (cca. 1 min). V závislosti na anatomických specifikách jednotlivých druhů ryb je nutné zvážit cesty přístupu do tělní dutiny, které budou představovat minimální riziko protržení zažívacího traktu. V případě kaprovitých ryb provádíme první vstupní řez v oblasti srdce, který následně slouží jako vstup pro vložení tupých nůžek, kterými vedeme stříh kaudálním směrem. Důležitým bodem je ukončit stříh 2-3 cm (v závislosti na velikosti ryby) od močopohlavní papily. Následně je veden řez za hlavou dorzálním směrem po obou stranách. Poté je uvolněna svalovina na obou bocích ryby, kdy je nutné postupně odstraňovat fascie pojící orgány dutiny břišní se stěnou břišní. V dalším kroku je vhodné pevně fixovat boční svalovinu a otevřít tělo ryby do tvaru V (Obr. 5). Poté je nutné s maximální možnou opatrností odstranit zažívací trakt. Při tomto kroku je nutné používat nešpičaté nástroje. V případě více pohlavně vyvinutých ryb je možné tělní orgány pouze odsunout a získat gonádu bez jejich kompletního vybavení. Vyjmutá gonáda je následně umístěna do pufrovaného fyziologického roztoku. V případě zpracování pouze jednoho jedince není nutné gonádu umísťovat do vychlazeného média. V případě zpracovávání několika jedinců je vhodné používat médium o teplotě 4 °C. Je nutné mít na paměti, že asepticky provedený odběr gonád je poměrně náročný čas (min. 10 minut na jedince). Tato doba nadále narůstá při odběru z více jedinců, jelikož je nutná důkladná dezinfekce pracovního místa a nástrojů. Vyjmutá gonáda by měla být pod binolupou následně očištěna od tukové tkáně a krevních kapilár.

Pro odběr gonád kapra pro další využití v podobných experimentech se jako alternativní metoda osvědčilo i otevření tělní dutiny řezem vedeným od hřbetu, kdy se minimalizuje riziko kontaminace odebíraného materiálu obsahem zažívacího traktu jedince (Obr.6). V tomto případě je nejprve veden řez šikmo za hlavou od hřbetu do přibližně poloviny výšky těla, další řez je pak nutné vést lineárně hřbetem a špičkou skalpelu nebo pomocí špičatých nůžek přerušovat žebra tak, aby v ideálním případě nedošlo k perforaci plynového měchýře a bylo možné tělní dutinu otevřít.



Obr. 4.: Donor zárodečných buněk – jedinec kapra obecného přibližně ve věku 12 měsíců (Foto: R. Franěk).



Obr. 5.: Otevření tělní dutiny u juvenilního samce kapra obecného před vyjmutím testes pro vyjmutí gonád (Foto: R. Franěk).



Obr. 6: Alternativní způsob otevření tělní dutiny u juvenilního samce kapra *obecného* pro vyjmutí gonád (Foto: V. Kašpar).

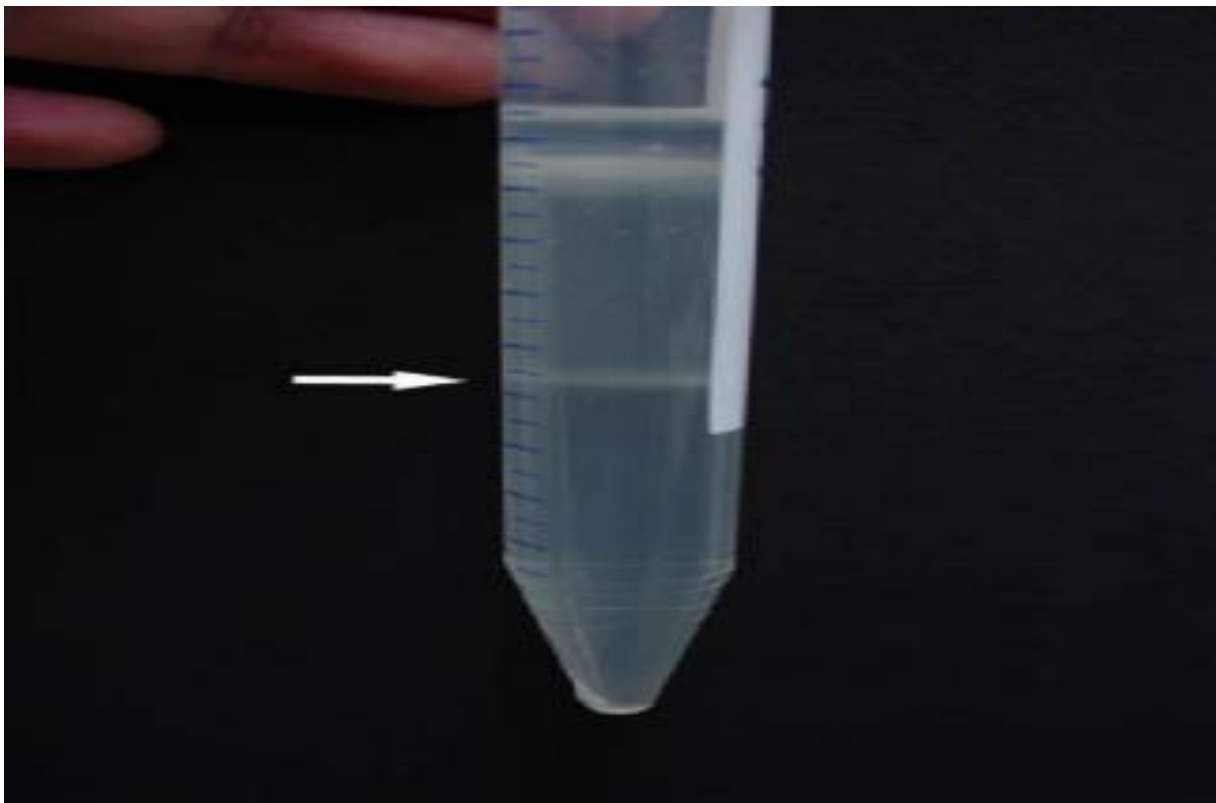
4.3 Disociace gonád kapra

Vyjmuté gonády nebo jejich části je po očištění od tukové tkáně a krevních kapilár nutné rozdělit pro disociaci na menší fragmenty – na hodinovém skle nebo Petriho misce jsou tak gonády ostrými nůžkami nebo skalpelem děleny na menší části. Prvotně je vhodné gonádu nakrájet na tenké (2-3 mm) silné plátky, které jsou následně převedeny do zkumavky, ve které jsou rozstříhány na jemné kousky pomocí nůžek.

Disociaci kousků tkáně provádíme pomocí enzymů, kdy je nutné respektovat biologii buněk a vlastnosti enzymu. Především se jedná o pH a teplotu, kdy tyto veličiny zásadně ovlivňují aktivitu většiny enzymů. V případě kaprovitých ryb žijících v temperovaném prostředí je nejvhodnější kombinace trypsinu a kolagenázy. Trypsin lze oproti kolagenáze považovat za agresivnější enzym, který je tzv. neselektivní a tráví veškerý materiál tkáně. Naopak kolagenáza je selektivní a tráví pouze spojení mezi jednotlivými buňkami. Vhodnou kombinací koncentrace trypsinu a kolagenázy lze docílit velice precizní disociace tkáně do formy buněčné suspenze avšak s minimálním poškozením buněčné membrány. Námi doporučené médium pro disociaci se skládá z pufovaného fyziologického roztoku, který obsahuje 0,15% trypsin a 0,1% kolagenázu.

Fragmenty gonády po rozmělnění jsou přeneseny do 50 ml zkumavek pro disociaci pomocí média obsahujícího 0,15% trypsin (T8003, Sigma Aldrich) a 0,1% kolagenázy (17100017, Thermo Fisher) rozpuštěné v PBS. Důležitým faktorem je poměr objemu fragmentů gonády a disociačního média který by měl být maximálně 1:4. Disociace je prováděna za pokojové teploty na laboratorní třepačce (pouze mírné míchání). V průběhu disociace je vhodné suspenzi kontrolovat a pozorovat jak v čase dochází ke zmenšování jednotlivých tkáňových fragmentů. Především v případě disociace testikulární tkáně může docházet k uvolnění a rozpuštění spermií jejichž DNA způsobuje agregaci fragmentů gonády. Tento stav je řešen přidáváním DNázy I (maximálně 500 μ l 0.05% roztoku na 25 ml média) Optimálně by měla disociace trvat 1,5 až 2 hodiny a měla by být ukončena před kompletním rozpuštěním všech fragmentů tkáně.

Disociace je ukončena přidáním 25 ml média L15 (Sigma-Aldrich) s 20% obsahem fetálního bovinního séra (FBS, Sigma-Aldrich, USA). Přítomnost L15 média a FBS neutralizuje zbytky enzymů a nedochází k dalšímu poškození buněk a jejich membrán. Před odstředěním je nutné suspenzi přefiltrovat, kdy je vhodné použít sterilní filtry o velikosti 30-40 μ m. V případě vysokého obsahu spermií v testes je nutné selektivně obohatit buněčnou suspenzi pomocí denzitního gradientu. Pro tyto účely je použit 30% Percoll gradient (Sigma-Aldrich, USA) (Obr. 7). Principem separace je rozdělení buněčné suspenze dle velikosti jednotlivých buněk. Ty největší buňky v suspenzi (zárodečné kmenové buňky) nejsou schopny projít denzní vrstvou koloidních částic. Naopak buňky násobně menší jako například spermatocyty II. řádu, spermatidy a spermie snadno procházejí a po odstředění tvoří na dně zkumavky peletu. Rozdělení buněčných frakcí pomocí Percoll gradientu bylo zabezpečeno centrifugací 50 ml zkumavek s 30% ředěním Percollu (Sigma-Aldrich, USA) v PBS při 800 g po dobu 30 minut. Vrstva s předpokládaným výskytem zárodečných kmenových buněk (spermatogonií) je pomocí pipety odebrána do další zkumavky, zředěna PBS a centrifugována dalších 10 minut při 300 g, vzniklá peleta je následně držena na šupinkovém ledu.



Obr. 7.: Odběr vrstvy obsahující zárodečné buňky po dělení směsi centrifugací v Percollu (Foto: R. Franěk).

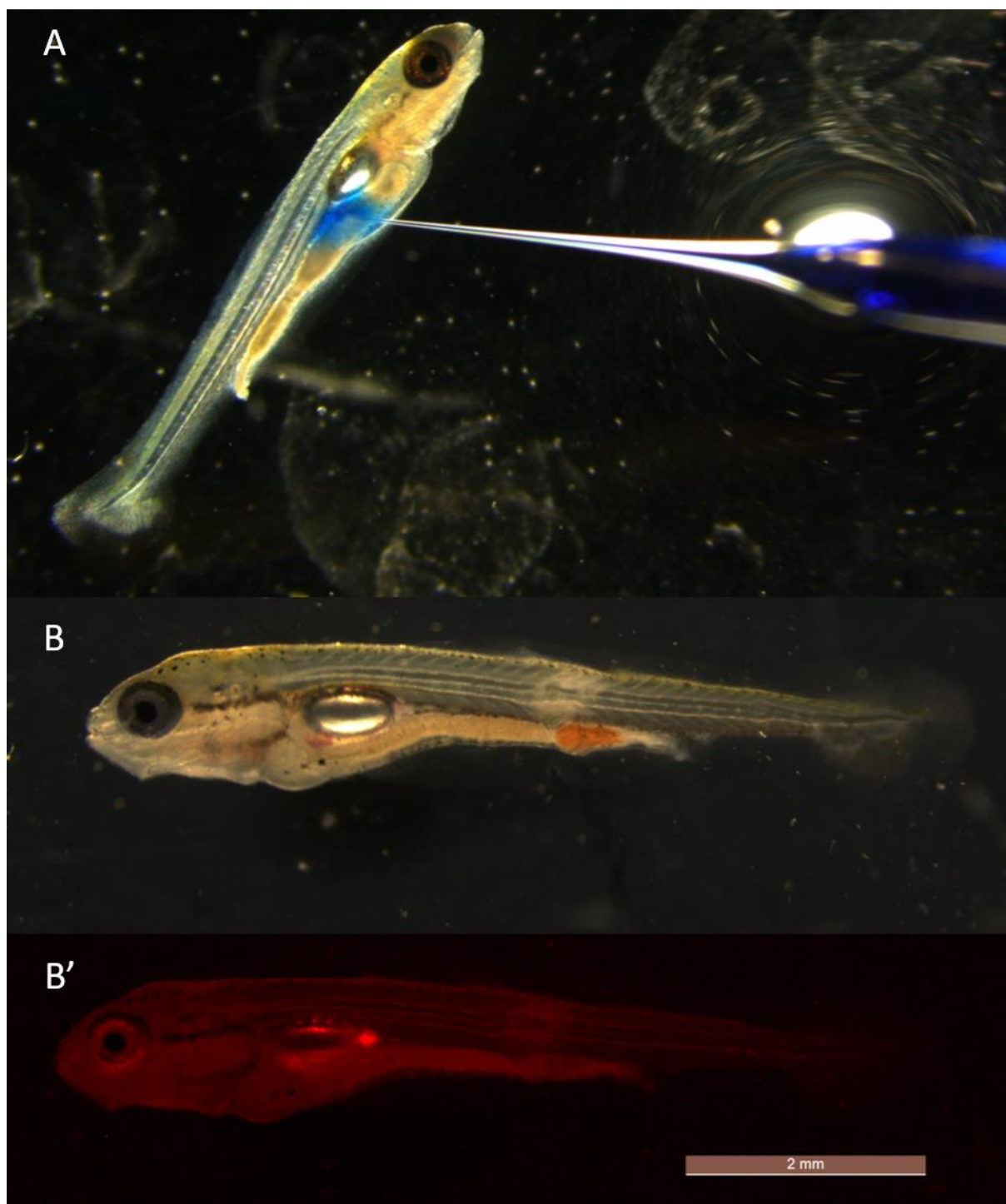
4.4 Transplantace zárodečných buněk

K samotné transplantaci přistupujeme 7 dní po oplození (inkubace při 22 °C), kdy již larvy aktivně přijímají živé krmivo. Sterilizované larvy karasa zlatého jsou anestetizovány v 0,05% roztoku MS222 a následně umístěny na Petriho misku potaženou běžným laboratorním 1% agarem. Skleněnou kapiláru plníme pomocí mikrošpiček izolovanou buněčnou suspenzí, kterou pomocí pneumatického injektoru (FemtoJet 4i, Eppendorf), mikromanipulátoru (Narishige, Japonsko) a binolupy (Obr. 8) transplantujeme do příjemců intraperitoneálně. Do každého jedince vpravujeme přibližně 10×10^4 buněk. Mikroinjekce směřujeme přibližně do tělní dutiny v okolí kaudální části plynového měchýře (Obr. 9).



Obr. 8. : Stereomikroskop Nikon, mikroinjektor Narishige a pneumatický injektor Femtojet 4i používaný k transplantaci zárodečných buněk (Foto: R. Franěk).

Pro účely monitorování buněk po transplantaci je účelné využít set komerčně dostupných membránových barviv (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma-Aldrich, USA). Pomocí značení na základě tohoto kitu lze detekovat buňky až po dobu 3 měsíců po transplantaci a průběžně hodnotit úspěšnost provedené transplantace a vývoj buněk. Samotné barvení pomocí PKH26 provádíme podle návodu výrobce, kdy na 10^7 buněk používáme 2 ml barviva, ve kterém buňky exponujeme po dobu jedné minuty a následně pomocí opakované centrifugace a výměny média odstraníme přebytky barviva. Pro vizualizaci při samotné transplantaci je vhodné použít například trypanovou modř.



Obr. 9.: Intraperitoneální transplantace fluorescenčně značených (PKH-26) zárodečných buněk kapra do larvy karasa obecného. A) Injikovaná suspenze je obarvená trypanovou modří pro lepší viditelnost. B) Snímek transplantované larvy karasa. B') Fluorescenční snímek pořízený pomocí binolupy Leica na kanálu dsRed, který umožňuje detekovat transplantované buňky se značenými membránami pomocí PKH-26. Převzato a upraveno podle Fraňka a kol. (2019b).

4.5 Odchov jedinců po transplantaci

Experimentální ryby a kontrolní jedince odchovááme dle běžných postupů, jelikož dále nevyžadují žádné zvláštní zacházení. Pro intenzivní rozkrm se nám osvědčilo použít laboratorní recirkulační systém ZebTec (Tecniplast, Itálie) (Obr. 10), následně do akvárií kde provádíme odchov při teplotě 20-25 °C, fotoperiodě 14L : 10D, krmením ad libitum žábřonožkami a v 5. den odchovu bylo započato s převáděním ryb na suché krmivo (Gemma micro, Skretting). Úplný převod odchovávaných ryb na suché krmivo ukončujeme ve 4 týdnech a následně převádíme ryby do větších akvárií. V předvýtěrovém období (cca 18 měsíců věku) je nutné provést individuální identifikaci ryb pomocí čipů a ryby přemísťujeme do 500 l nádrží s řízeným ohřevem / chlazením a recirkulací vody.



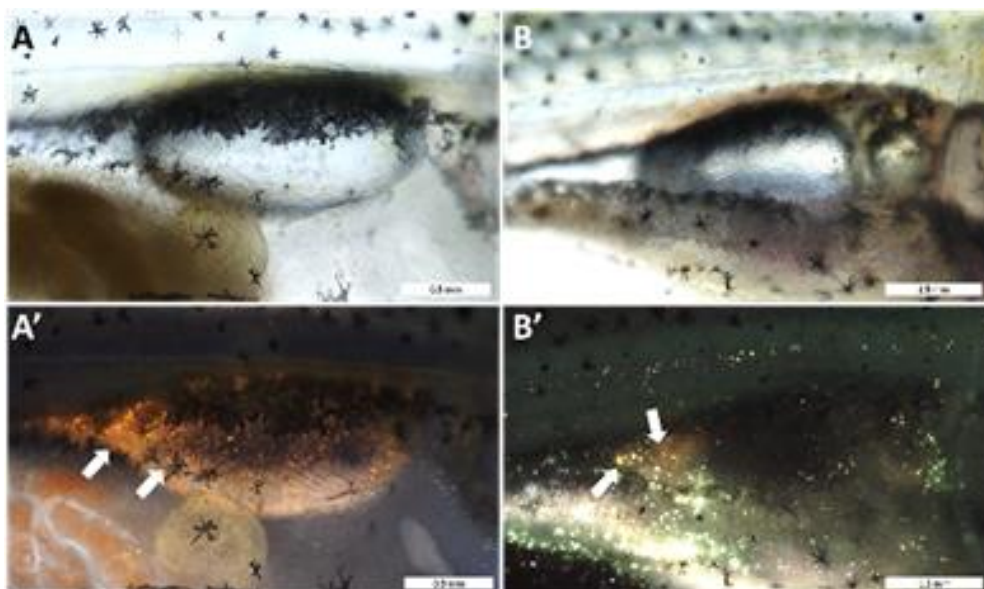
Obr. 10.: Systém ZebTec využívaný pro rozplavání a první dny odchovu jedinců po transplantaci (Foto: R. Franěk).

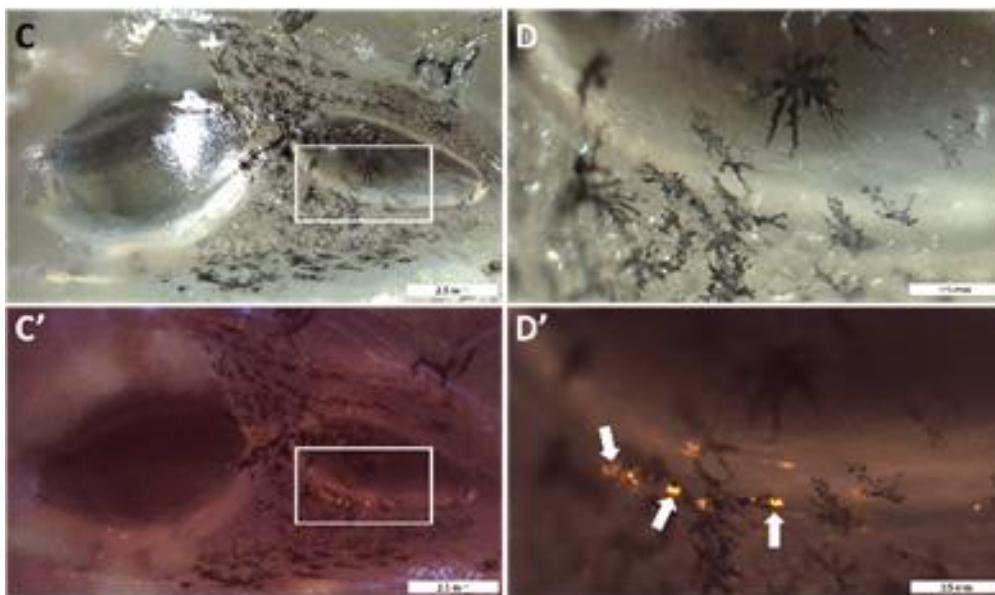
4.6 Sledování vývoje gonády

Vývoj gonád lze u jedinců po transplantaci sledovat díky značení pomocí látky PKH 26. V případě nutnosti průběžného hodnocení úspěšnosti transplantace a kolonizace zárodečné lišty jedinců po transplantaci je možné sledování provádět u celých ryb v počáteční fázi odchovu a po několik dnů po transplantaci, v případě starších ryb (až 30 dnů) jsou takoví jedinci předávkováni anestetikem (viz. výše) a podrobeni pitvě a gonády prohlíženy uvnitř trupu. Látka PKH dovoluje vizualizaci transplantovaných buněk pod fluorescenčním osvětlení – emisi 552 nm a excitaci 595 nm.

V případě našich experimentálních aktivit byla sledována úspěšnost transplantace den po transplantaci, kdy byl viditelný vysoký počet fluorescenčních buněk podél celého plynového měchýře, přičemž subjektivně nejsilnější intenzita signálu kolem jeho kaudální části byla pravděpodobně dána místem vpichu kapiláry (Obr. 11, A-A'). Znatelné snížení počtu fluorescenčně značených buněk bylo pozorováno 1 týden po transplantaci, když se v těsné blízkosti plynového měchýře nacházelo jen několik jednotlivých buněk (Obr. 11, B-B'). Tato skutečnost je dána tím, že pouze několik jednotlivých buněk je schopno kolonizovat gonádu příjemce. Pitva provedená 1 měsíc po transplantaci a následná vizualizace pod binolupou však ukázala, že se fluorescenčně značené buňky shlukují v utvářených pohlavních žlázách (Obr. 11, D-D'). V tento okamžik je možné již poměrně přesně odhadnout úspěšnost transplantace a následně předpokládat počet dospělých chimér. Z osmi pitvaných ryb ve věku 1 měsíce vykazovalo 5 ryb známky fluorescence buněk značených PKH26.

Tento postup tak lze plně doporučit pro průběžné hodnocení úspěšnosti transplantace a odhad počtu chimér v populaci recipientů.





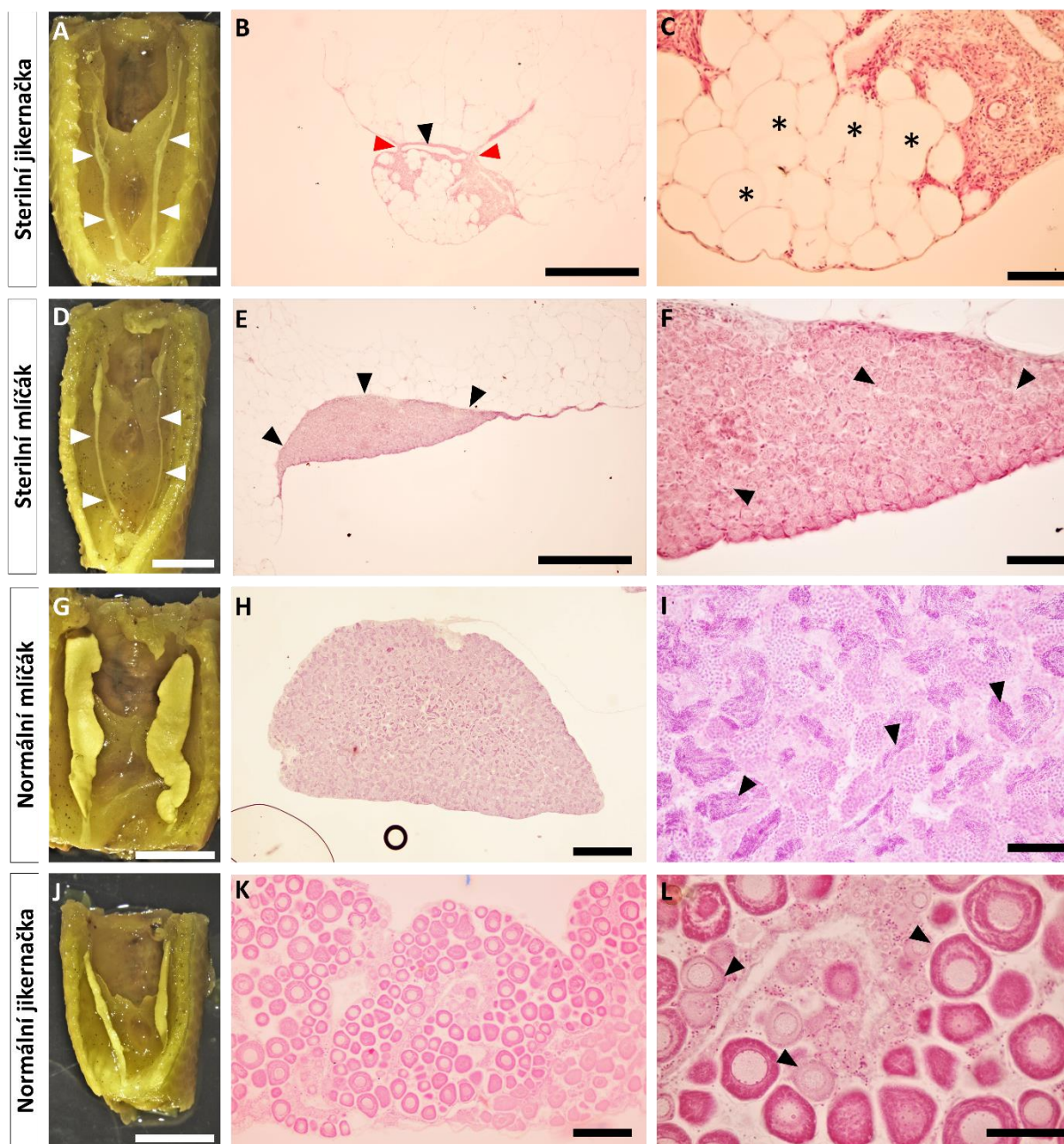
Obr. 11.: Kolonizace zárodečné lišty karasů po transplantaci zárodečných buněk, vizualizace pomocí značení zárodečných buněk PKH26. A) 24 hodin po transplantaci, B) 7 dní po transplantaci, C) a D) 30 dní po transplantaci, apostrof značí vizualizaci pomocí fluorescence. Grafika převzata z původní publikace Franěk a kol. 2021.

4.7 Histologické vyšetření

Pro detailní vyhodnocení vývoje gonád je vhodné použít rutinní histologické vyšetření dostačeného množství jedinců. Jednak je důležité potvrdit sterilitu kontrolní skupiny bez transplantace, ale také vývoj gonád chimér. Za tímto účelem je nutné usmrtit vhodné jedince předávkováním anestetikem MS 222 v dávce 400 mg.l^{-1} (Sigma-Aldrich, USA) a následně provést disekci. Pro potřeby přípravy histologických preparátů je nutné oddělit hlavu a ocas, otevřít břišní dutinu a pečlivě ~~byl~~ vyjmout zažívací trakt a plynový měchýř. Takto získané torzo se přes noc inkubuje v Buinově fixačním roztoku, následně promývá 70% etanolem. V případě velmi slabě vyvinutých gonád je velmi obtížné gonádu z trupu vyjmout, proto je třeba přistoupit k prvotní fixaci až s následným vyjmutím. Materiál pro histologické preparáty je možné zpracovat pomocí tradičního zalití do parafínu, nebo pomocí pryskyřice (resinu), která nabízí excelentní morfologii studované tkáně. Pro zalití do pryskyřice je praktické použít některý z komerčně dostupných kitů (JB-4 Embedding Kit, Sigma-Aldrich, USA) podle standardního protokolu (Sullivan-Brown, 2011). Gonády jsou odvodněny v etanolové sérii, rozděleny na fragmenty a inkubovány v infiltračním médiu, poté vloženy do forem a zality pryskyřicí. Histologické řezy jsou krájeny na rutinním mikrotomu s vhodným nožem na tloušťku $5 \text{ }\mu\text{m}$. Natažené řezy jsou barveny v hematoxylinu a eosinu, převedeny etanolovou řadu do xylenu a následně „montovány“ vhodným médiem podle standardního protokolu (Sullivan-Brown a kol., 2011) do podoby trvalých histologických preparátů k dokumentaci při prohlížení pod mikroskopem.

Histologickému vyšetření byli při naší experimentální práci podrobeni sterilizovaní jedinci karasa (20 kusů) a běžní jedinci karasa (4 kusy) jako kontrola, a to jako ryby ve věku 2 let. U

ryb z kontrolní skupiny bylo fenotypově určováno pohlaví – ovariální tkáň byla u sterilizovaných fenotypových samic méně kompaktní než u sterilizovaných fenotypových samců (Obr. 12). Sterilní fenotypoví samci měli výrazně užší a bělejší gonády ve srovnání se sterilizovanými samicemi. U 6 jedinců ošetřených MO pak nebylo možné fenotypově pohlaví určit. U ryb z kontrolní skupiny pak bylo možné pozorovat gonády vyvíjející se normálním způsobem.



Obr. 12. Vývoj gonád u jedinců karasa po ošetření genovým konck-downem pomocí MO. A) sterilní karas identifikovaný jako samice podle širší a částečně průhledné gonády, B) histologický řez zobrazující ovariální dutinu (černá šipka) spojenou s břišní stěnou (červené šipky), C) řez ovariem sterilizované samice, D) sterilizovaný karas identifikovaný jako samec podle bílých netransparentních gonád trubicovitého tvaru, E) histologický řez zobrazující samčí gonádu pevně přichycenou k břišní stěně (černé šipky), F) nedostatečně vyvinutá gonáda postrádající spermie (černé šipky). G) samec z kontrolní skupiny s vyvinutým testes, H) a I) histologické řezy gonády samce z kontrolní skupiny, černé šipky

znázorňují lumeny naplněné spermiemi, J) samice z kontrolní skupiny s vyvinutými ovarii, K a L) histologické řezy gonády samice z kontrolní skupiny obsahující oocyty v primárním růstové fázi a kortikální alveoly znázorněné černými šipkami. Měřítka na snímcích A, D, G, J – 1 cm; B, E 0,5 mm; C, F, I, L, K - 50 μ m, H – 0,5 mm (Foto: R: Franěk).

4.8 Reprodukce chimér

Pro dozrávání gamet a dosažení úspěšné reprodukce karasa je nutné v průběhu odchovu generační ryby vystavovat fluktuaci teploty i fotoperiody, aby bylo nasimulováno překonávání zimního období přirozeného odchovu. Dále je pak nutné umělou reprodukci indukovat injekcí hypofýzy. V případě reprodukce jedinců po transplantaci zárodečných buněk byla teplota vody v odchovném systému snižována postupným způsobem až na 8 °C a při této teplotě byly ryby drženy minimálně 6 týdnů, poté byla postupně teplota zvyšována až na 21 °C. Souběžně byla zkracována fotoperioda až na 8 hodin světla denně, poté byla znovu fotoperioda prodlužována až na 14 hodin během zvyšování teploty odchovu.

Umělou reprodukci chimér a kontrolní skupiny ryb je nutné indukovat opakovanou intraperitoneální injekcí suspenze kapří hypofýzy (0,5 a 2,5 mg na kg tělesné hmotnosti) s rozestupem 12 h mezi aplikacemi. Ovulaci nebo spermiaci je vhodné zjišťovat 12 h po podání druhé dávky hypofýzy.

V našem experimentu bylo sperma odebíráno 24 h po injekci pomocí 1 ml pipety a přeneseno do 1,5 ml zkumavek a skladováno na šupinkovém ledu. Samci většinou po první dávce hypofýzy vykazovali známky třecí vyrážky (Obr. 13). U každého samce produkujícího spermie byl objem získaného spermatu měřen pipetou a po naředění v imobilizačním roztoku byla určována koncentrace spermií pomocí Bürkerovy počítací komůrky pro určení reprodukčních parametrů chimér a porovnání s jedinci kontrolní skupiny. Jikry byly v případě úspěšné ovulace odebírány do 50 ml zkumavek (Obr. 14) od všech chimér i ryb z kontrolní skupiny a skladovány při 10 °C v laboratorním inkubátoru do doby oplození.



Obr. 13.: Třecí vyrážka na skřelích chiméry samčího pohlaví – samec uvolňující sperma po indukci reprodukce pomocí kapří hypofýzy (Foto: V. Kašpar).



Obr. 14.: Získávání jiker od chiméry - samice uvolňující jikry po indukci reprodukce pomocí kapří hypofýzy (Foto: V. Kašpar).

V reprodukční sezoně 2019 bylo sperma úspěšně získáno od 25 chimérních mlíčáků (GC M1 – GC M25) ve věku 24 měsíců. Genotypování pomocí druhově specifických oligonukleotidů (viz kapitola 4.9) později odhalilo přítomnost DNA kapra u všech analyzovaných vzorků, zatímco amplikony specifické pro karasa detekovány nebyly. Tudíž chiméry produkovaly pouze gamety dárce – kapra obecného. Dvě chiméry samičího pohlaví ve věku 24 měsíců ovulovaly malé množství jiker (GC F1 cca 240 jiker, GC F2 přibližně 360 jiker), jejichž oplození nebylo příliš efektivní (oplozenost F1 25% jiker a 31,9 % jiker u F2). Vývoj oplozených jiker byl navíc opožděný a proto byla inkubace ukončena a embrya byla fixována pro další analýzy. Produkce kapra pomocí náhradního rodiče nebyla v roce 2019 pomocí náhradních rodičů ve věku 28 měsíců úspěšná, všechna fixovaná embrya (N=123) však byla později genotypováním pomocí druhově specifických primerů (viz. kapitola 3.9) identifikována jako kapří.

Během druhé reprodukce chimér v roce 2020 byly gamety získány od 23 samců (GC M1 – GC M25) a 8 samic (GC F1 - GCF8) ve věku 36 měsíců. U většiny jedinců bylo v této sezoně pozorováno typické reprodukční chování a u samců se na skřelích vyvinuly zcela jasné známky třecí vyrážky (Obr. 12). Celkové výsledky reprodukce jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 1).

Tab. 1.: Dosažené výsledky reprodukce – počty reprodukováných chimér ve věku 28 a 36 měsíců.

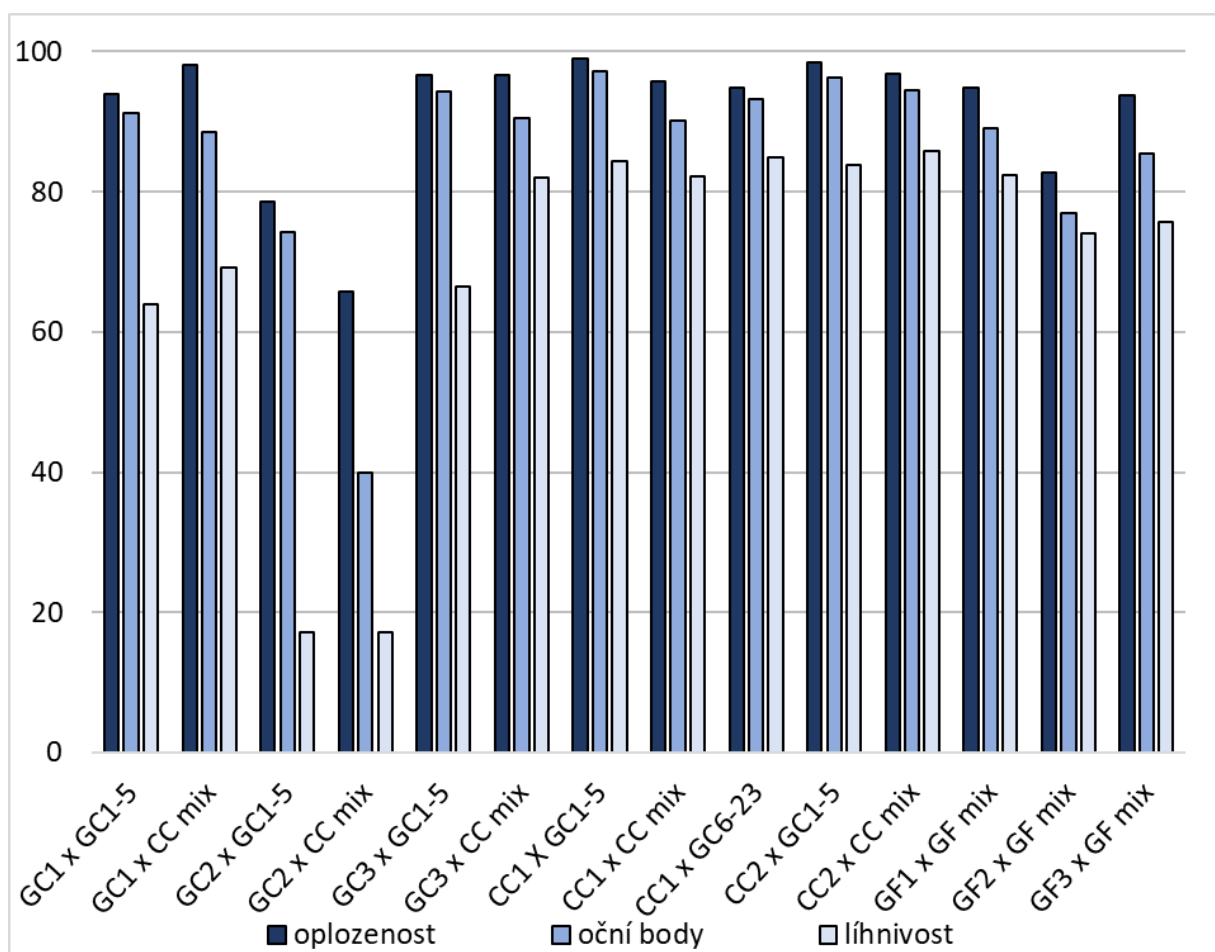
Rok reprodukce	Ryb celkem (n)	Chiméry		Nereprodukované (n, %)
		Samci (n, %)	Samice (n, %)	
Reprodukce 2019	72	25 (33%)	2 (3%)	45 (62%)
Reprodukce 2020	71	23 (32%)	8 (11%)	40 (56%)

Reprodukce chimér v roce 2020 probíhala souběžně s provozní reprodukcí běžných jedinců karasa a provozním výtěrem kapra tak, aby bylo možné gamety kapra použít ke kontrolnímu oplození nebo mezidruhovému křížení. V roce 2020 se podařilo získat i jikry od chimér a bylo podle kombinací rodičovských druhů provedeno několik typů oplození. Malé porce získaných jiker od chimér GC F1, GC F2 a GC F3 byly jednotlivě oplodněny spermatem získaným od chimér (n=5), které produkovaly sperma už v přechodném roce a byly identifikovány jako jedinci produkující výhradně sperma donora (kapra). Vedle toho byly gamety těchto chimér oplozovány spermatem získaným od několika jedinců kapra (CC mix). Naopak jikry získané od 2 jikernaček kapra (CC1 a CC2) byly oplozovány spermatem ověřených chimér (GC1-GC5) a jednotlivými mlíčáky kapra (GC6-23) a provedeno bylo i kontrolní oplození s gametami karasa (GF1 – GF3 x GF mix). Oplození bylo realizováno na Petriho miskách, po přilepení jiker byly tyto misky přeneseny do experimentálního inkubátoru s cirkulující vodou o teplotě 21 °C (Obr. 3) a zde proběhlo vykulení a rozplavání plůdku. Zaznamenané reprodukční charakteristiky samic jsou sumarizovány v tabulce (Tab.2).

Tab. 2: Reprodukční charakteristika ryb – samic chimér (GC1-3), kapra (CC1-3) a karasa (GF1-3). Index * zvýrazňuje statisticky významné rozdíly mezi druhy (GC x CC x GF).

	Relativní plodnost – počet jiker/hmotnost (n)	Absolutní plodnost – počet jiker (n)	Hmotnost jedince (g)
GC1	56	12838	230
GC2	48	4075	85
GC3	33	3610	110
CC1	128*	338257*	2640
CC2	85*	264043*	3110
CC3	86*	309502*	3600
GF1	62	7464	120
GF2	70	6086	87
GF3	56	8345	150

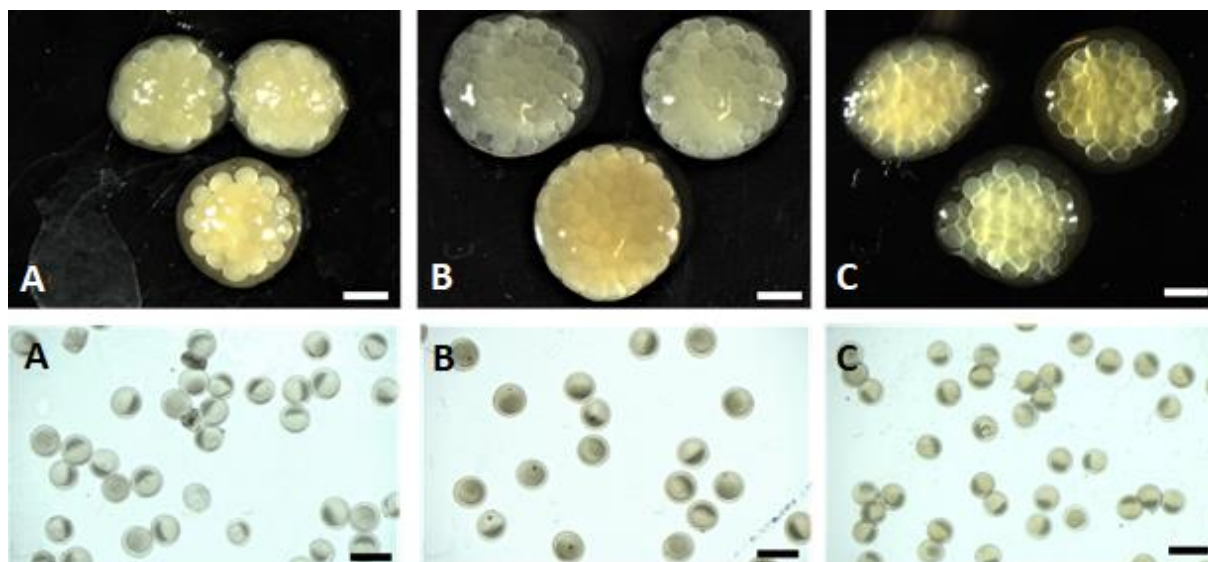
V průběhu inkubace byla sledována úroveň oplozenosti (v průběhu stádia blastuly), přežití v očních bodech (3 dny po oplození) a líhivost plůdku z celkového počtu oplodněných jiker. Jikry jednotlivých jikernaček chimér po oplození spermatem mlíčáků ze stejné skupiny vykazovaly vysokou úroveň oplozenosti ($78,5 \pm 12,8\%$ - $96,7 \pm 3,4\%$), zastoupení jiker v očních bodech ($74,2 \pm 12,1\%$ - $94,3 \pm 3,8\%$). Zaznamenáván byl i podíl rozplavaného plůdku ($17,1 \pm 11\%$ - $66,4 \pm 9,1\%$). Jikry chimér (GC1-GC3) pak byly oplozovány i spermatem získaným od mlíčáků kapra (CC mix) a zjištěna byla znovu relativně vysoká úroveň oplození ($65,7$ - $98,1\%$), zastoupení jiker v očních bodech (40 - $90,5\%$) a rozplavání plůdku ($17,1$ - 82%). Sperma jednotlivých chimérních samců pak bylo použito k oplození jiker kapra znovu byla zaznamenána vysoká úroveň oplozenosti ($94,8 \pm 3,7\%$), zastoupení jiker v očních bodech ($93,2 \pm 4,2\%$) a rozplavání plůdku ($84,9 \pm 6,5\%$) – viz. Graf 3.



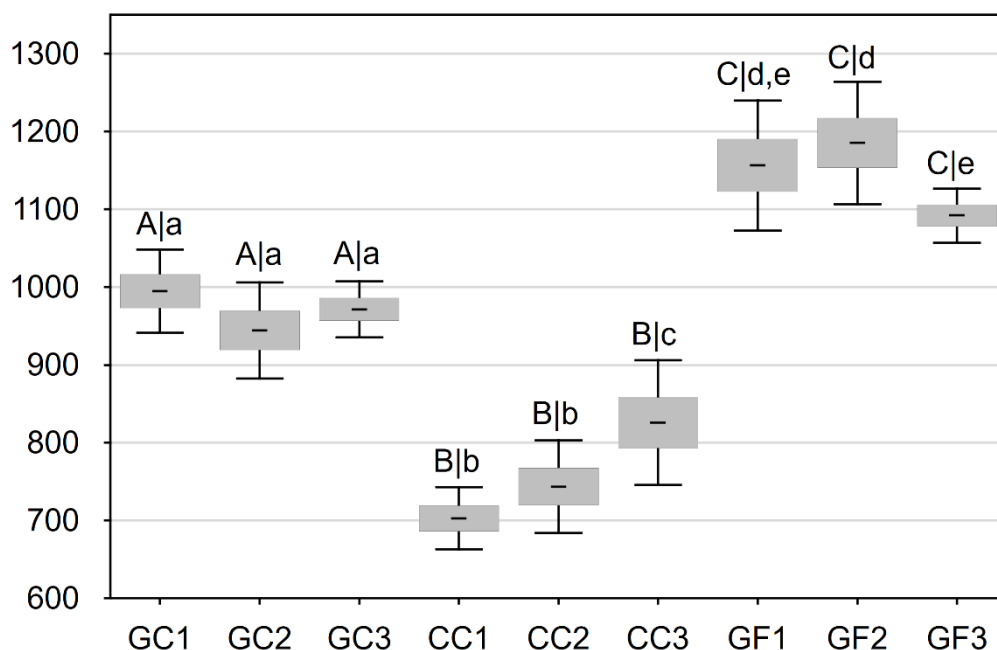
Graf 3.: Výsledky reprodukce ryb ve věku 36 měsíců - oplozenost, zastoupení jiker v očních bodech a líhnivost jiker chimér (GC1, GC2, GC3), kapra (CC1, CC2) a karasa (GF1, GF2, GF3) při oplození spermatem chimér (GC 1-5, GC6-23), kapra (CC mix) a karasa (GF mix).

Výsledky oplození ukázaly, že transplantací zárodečných buněk kapra (spermatogonií) do sedmidenních larev karasa lze získat chiméry produkující zcela funkční gamety. Celkem se podařilo reprodukovat 43% jedinců po transplantaci zárodečných buněk, přičemž 11% tvořily samice a 32% samci. Zaznamenaná vysoká úroveň oplozenosti při vzájemném křížení chimér pak potvrdila použitelnost této strategie pro další aplikace.

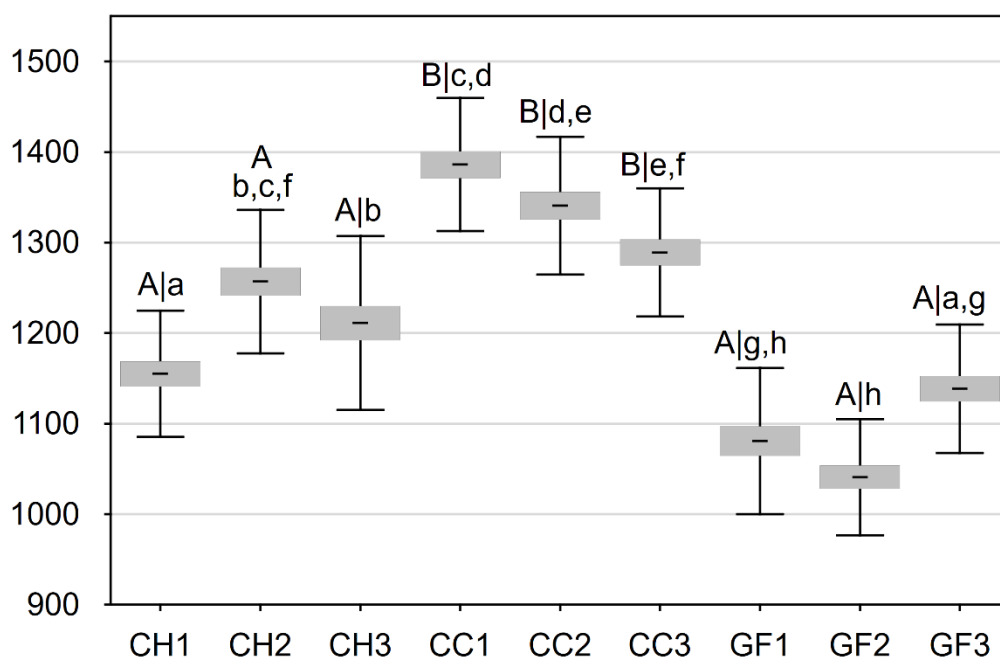
Jednotlivé samice chimér podle analyzovaných dat produkovaly výrazně vyšší počet jiker v 1 g ve srovnání s běžnými jedinci kapra, zároveň zaznamenané počty jiker byly nižší ve srovnání s počtem jiker zaznamenaným u samic karasa z kontrolní skupiny (Graf 4). Relativní plodnost kalkulovaná jako počet jiker na gram tělesné hmotnosti generační ryby se významně nelišil mezi chimérami a samicemi karasa z kontrolní skupiny, byl však znatelně nižší než relativní plodnost samic kapra reprodukováných pro experimentální křížení a absolutní plodnost vykazovala stejný trend (Tab. 2). Průměr neoplozených jiker chimér se pak výrazně lišil od průměru jiker kapra (Graf 5). Barva jiker získaných od chimér byla od nažloutlé až po nazelenalou, což odpovídá normálnímu spektru barev jiker kapra a karasa (Obr. 15).



Obr. 15:. Jikry chimér (A), kapra (B), kontrolních jedinců karasa (C) před oplozením a vyvíjející se embrya ve stádiu blastuly 4-5 hodin po oplození (zobrazení ve světlém poli), měřítko 2 mm. Grafika převzata z původní publikace Franěk a kol. (2021).



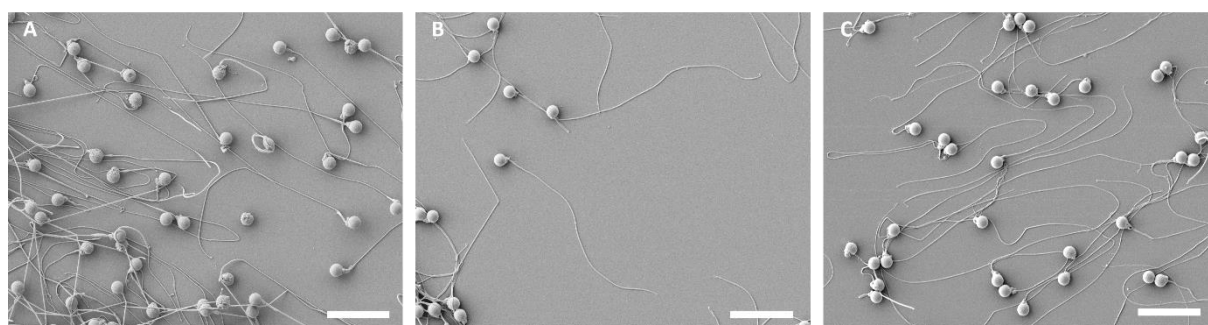
Graf 4.: Počet jiker v 1 g určený u chimér (GC1, GC2, GC3), kapra (CC1, CC2, CC3) a karasa (GF1, GF2, GF3). Uváděny jsou průměry hodnot $\pm$ interval spolehlivosti a směrodatná odchylka hodnot. Indexy značené velkými písmeny označují rozdíly mezi skupinami ryb (chiméra, kontrola kapr, kontrola karas), indexy psané malými písmeny pak označují statisticky významné rozdíly mezi jedinci.



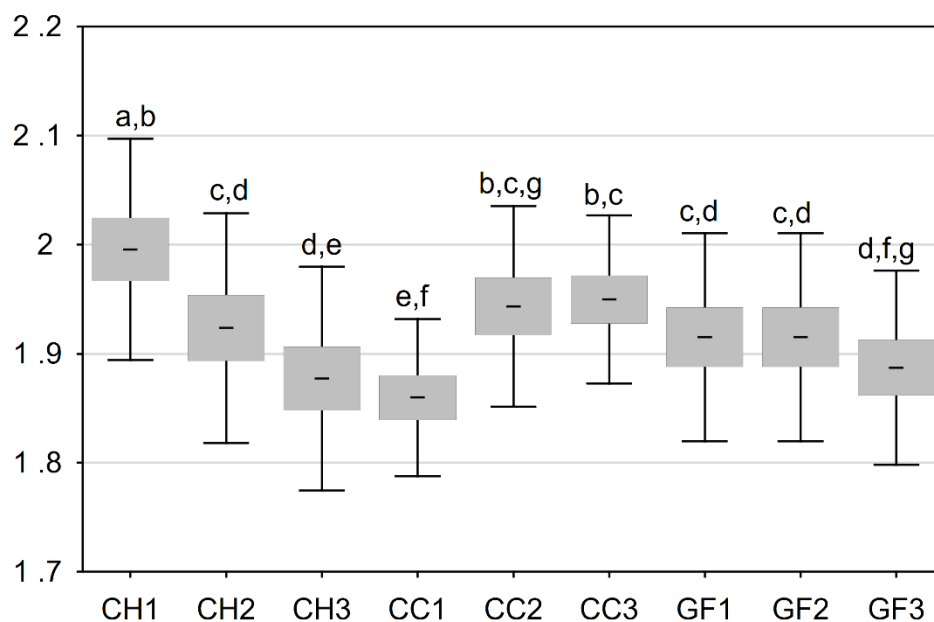
Graf 5.: Průměr jiker (μm) určený u chimér (GC1, GC2, GC3), kapra (CC1, CC2, CC3) a karasa (GF1, GF2, GF3). Uváděny jsou průměry hodnot $\pm$ interval spolehlivosti a směrodatná odchylka hodnot. Indexy značené velkými písmeny označují rozdíly mezi skupinami ryb (chiméra, kontrola kapr, kontrola karas), indexy psané malými písmeny pak označují statisticky významné rozdíly mezi jedinci.

Chiméry samčího pohlaví produkovaly v roce 2020 průměrně $0,11 \pm 0,07$ ml spermatu o koncentraci $10,7 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^6$ v μl . V porovnání s kontrolními jedinci karasů nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly v koncentraci spermií nebo relativní produkci spermií na 1 g tělesné hmotnosti. Celkový objem spermatu byl u chimér o třetinu nižší než u jedinců stejného druhu z kontrolní skupiny a přibližně 50x nižší než objem získaný od třech jedinců kapra použitých pro experimentální křížení.

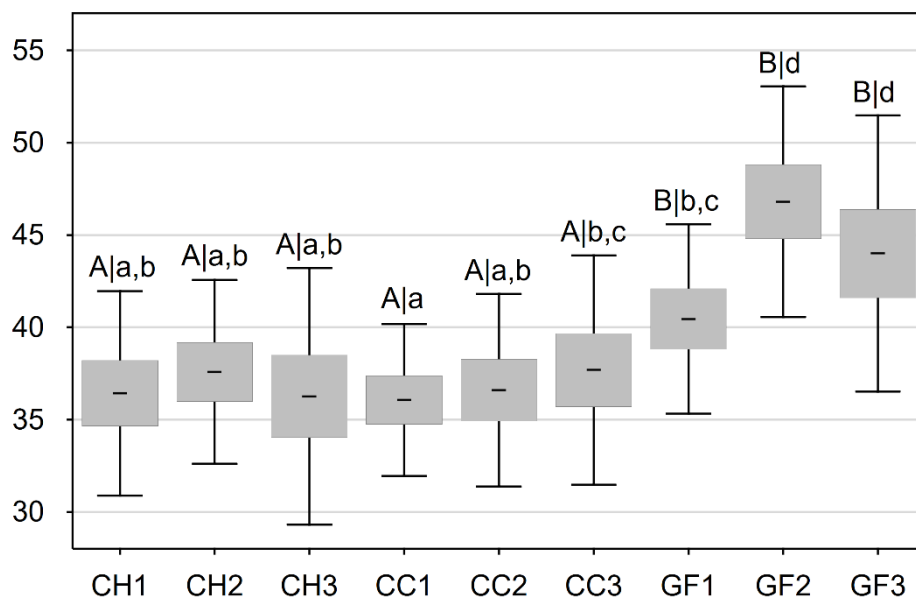
Sperma 3 jedinců z každé skupiny - chimér, karasů z kontrolní skupiny a tří jedinců kapra bylo vzorkováno pro skenovací elektronovou skenovací mikroskopii (SEM). Sperma bylo nejprve naředěno imobilizačním roztokem Kurokura 180 a poté fixováno v 2,5% glutaraldehydu v PBS, poté fixováno pomocí 4% oxidu osmičelého, promyto v PBS, dehydratováno acetonovou sérií a vysušeno pomocí Pelco CPD2, přichyceno na kovovou sítku a potaženo zlatem pomocí E5100 (Polaron Equipment). Pomocí skenovací elektronové mikroskopie SEM byla sledována morfologie spermií a ukázalo se, že některé charakteristiky spermií jako například délka hlavičky spermií nebo její šířka vykazovaly u spermií získaných od chimér značnou variabilitu. Nicméně, spermie jednotlivých druhů se statisticky významně nelišily v těchto sledovaných parametrech. Oproti tomu délka bičíku spermií získaných od chimér a délka bičíku spermií kapra se statisticky významně lišily od délky bičíku spermií karasa. Pomocí SEM nebyly zaznamenány žádné abnormality spermií jako abnormálně tvarované hlavičky spermií nebo dvoubičíkaté spermie u žádné z chimér ani kontrolních jedinců karasa či kapra.



Obr. 16.: Dokumentace preparátů ze SEM – spermie chimér (A), kapra (B) a karasa (C). Měřítka v rohu grafiky 10 μm . Grafika převzata z původní publikace Franěk a kol., 2021.



Graf 6: Délka hlavičky spermie (μm) určovaná u chimér (CH1, CH2, CH3), kapra (CC1, CC2, CC3) a karasa (GF1, GF2, GF3). Uváděny jsou průměry hodnot $\pm$ interval spolehlivosti a směrodatná odchylka hodnot. Indexy psané malými písmeny označují statisticky významné rozdíly mezi jedinci.



Graf 7. Délka bičíku spermie (μm) určovaná u chimér (CH1, CH2, CH3), kapra (CC1, CC2, CC3) a karasa (GF1, GF2, GF3). Uváděny jsou průměry hodnot $\pm$ interval spolehlivosti a směrodatná odchylka hodnot. Indexy značené velkými písmeny označují rozdíly mezi skupinami ryb, indexy psané malými písmeny pak označují statisticky významné rozdíly mezi jedinci.

4.9 Určení druhové příslušnosti

Pro ověření efektivity transplantace zárodečných buněk je možné využít genotypování pomocí druhově specifických primerů. Genomovou DNA je možné izolovat některou z běžných metod, nejlépe s pomocí některého z komerčně dostupných kitů. Pro zpracování této metodiky a vyhodnocení realizovaných experimentů byla genomová DNA ze spermií, larev nebo ústřížků ploutve ryb izolována pomocí kitu PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), druhově specifické primery pro PCR amplifikaci byly navrženy pomocí nástroje Primer-Blast NCBI. Primery byly validovány jako druhově specifické ověřením s DNA jednotlivých druhů.

Pomocí těchto primerů (Tab. 3.) je možné genotypovat vzorky z gonád nebo spermatu získaného od karasů po transplantaci zárodečných buněk a plůdek z experimentálních oplození chimér. Nejsnazším způsobem genotypování je PCR amplifikace využívající PPP master mix (TopBio, ČR) skládající se z 30 cyklů opakujících 94 °C po dobu 30 s, 58 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 30 s a následné elektroforetické dělení PCR produktů na 2% agarosovém gelu s vizualizací pomocí UV iluminátoru.

Tab. 3.: Popis druhově specifických primerů pro určení druhové příslušnosti.

Druh - gen	GenBank ID	Forward primer 5'-3'	Délka PCR produktu (bp)
		Reverse primer 5'-3'	
Kapr - recombination activating protein 1 (<i>C-rag1</i>)	KJ474764.1	F: CTGTGGTAGCAGAGCGGAAA R: CCTGTCCCCCGGAATAAGAAC	97
Karas - recombination activating protein 1 (<i>GF-rag1</i>)	DQ196519.1	F: GTTCTTCTTCCGAGGCACAGG R: TTCTGAGACGCTTCAGCTCG	123
Karas- cytochrome b (<i>GF-cytb</i>)	EF055472.1	F: CATTGCCCGGGCCTATATT R: GTATGGCACGGCGGATAGAA	175

Při vyhodnocení našich experimentů genotypování pomocí druhově specifických primerů zacílené na *Cytochrome b* a *recombination activating protein 1* ukázalo, že DNA izolovaná ze spermatu chimér produkovala PCR produkty pouze s primery specifickými pro geny kapra, nikoliv s primery specifickými pro geny karasa.

Pozdější analýza potomstva z každého vzájemného křížení chimér pak stejným způsobem potvrdila, že potomstvem jsou kapři, jelikož DNA izolovaná z jedinců vzniklých tímto křížením znovu produkovala PCR produkty pouze s primery specifickými pro geny kapra. Z každé kombinace křížení chimér bylo genotypováno 10 jedinců, celkem bylo genotypováno 421 kusů plůdku.

Genotypování jiker lze provést na základě izolace RNA, například pomocí kitu PureLink RNA Mini Kit. Izolovanou RNA je nutné použít k reverzní transkripci na DNA, například s využitím kitu WizScript™ RT FDmix (Wizbiosolutions, Jižní Korea). Ke genotypování je pak možné použít druhově specifické primery (Tab. 4.) zacílené na gen *ddx4* (*vasa*), který je považován za marker

zárodečných buněk u obou druhů. PCR s těmito primery by měla být realizována prostřednictvím 30 cyklů opakujících 94 °C po dobu 30 s, 58 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 30 s a PCR produkty by měly být elektroforeticky děleny na 2% agarosovém gelu a vizualizovány pomocí UV iluminátoru.

Tab. 4.: Popis druhově specifických primerů použitých pro určení druhové příslušnosti z transkriptu RNA jiker.

Druh - gen	GenBank ID	Forward primer 5'-3'	Délka PCR produktu (bp)
		Reverse primer 5'-3'	
Kapr - DEAD box RNA helicase Vasa mRNA (C- <i>vasa</i>)	AF479820.2	F: CGGTGGTGAAGTTAATCGTCT R: ATCACCAGCAGTCGTCTTCC	214
Kapr – actin Beta	XM_019089433.1	F: TGGCCTCTCTGTCCACCTTC R: CCTTTCCAGTTTCCGCATCC	229
Karas - ATP-dependent RNA helicase DDX4 (GF- <i>vasa</i>)	XM_026273070.1	F: CATTGCCCCGGGCCTATATT R: GTATGGCACGGCGGATAGAA	166
Karas – actin Beta	XM_026258408.1	F: TGCAGAAAGAGATCACTTCCCT R: TGAATCCTACTGCATGGCCA	233

V rámci optimalizace metodiky byly v roce 2020 získány jikry od celkem 8 chimér samičího pohlaví. Na základě reversní transkripce získaná DNA byla polymerázovou řetězovou reakcí amplifikována s primery pro gen *vasa* a *actin Beta* obou druhů a ukázalo se, PCR produkty byly získány pouze s primery specifickými pro kapra. Tím byl potvrzen původ jiker v transplantovaných zárodečných buňkách donora.

4.10 Zhodnocení efektivity metodiky

Po optimalizaci všech dílčích kroků transplantace a úspěšném odchovu jedinců vzniklých transplantací se podařilo reprodukovat chiméry vzniklé transplantací zárodečných buněk kapra do těla karasa. Zárodečné buňky z testes kapra úspěšně proliferovaly v těle karasa a ryby ve věku 2 let produkovaly samčí gamety, ve věku 3 let pak ryby produkovaly oplození schopné gamety obou pohlaví.

Přibližně třetina karasů po transplantaci vyprodukovala gamety donora. Dříve ověřená 40-60% úspěšnost transplantace testikulárních a ovariálních zárodečných buněk odpovídá nyní zjištěnému poměru dospělých chimér produkujících potomstvo náležící k druhu donora. Lze tedy konstatovat, že úspěšnost transplantace 2-3 měsíce po transplantaci poskytuje vcelku spolehlivý odhad počtu chimér produkujících gamety v pozdějším věku a úspěšnost transplantace určená podle proliferace značených buněk 2-3 měsíce po transplantaci je vhodným indikátorem úspěšnosti při praktickém použití transplantace zárodečných buněk.

Karas zlatý jako hostitel transplantovaných buněk poskytuje výhodu menší délky těla a hmotnosti (největší reprodukováná samice vážila 230 g, průměrná hmotnost samců v roce 2020 činila 81 g) a díky tomu bylo možné odchovávat všechny jedince po transplantaci v kontrolovaných podmínkách. Oproti původnímu předpokladu zkrácení generačního intervalu a zkrácení produkce kapra obecného byla zaznamenána efektivní reprodukce karasa samičího pohlaví až ve věku 36 měsíců a významného zkrácení reprodukčního cyklu kapra obecného pomocí transplantace zárodečných buněk tak dosaženo nebylo. Ve věku 36 měsíců se podařilo reprodukovat 43% jedinců a v rámci experimentálního křížení bylo dosaženo relativně vysoké úrovně oplození a získaná embrya byla pomocí molekulárních metod identifikována jako kapří.

5. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Tato metodika je detailním popisem všech postupů optimalizovaných pro transplantaci zárodečných buněk kapra do těla karasa a popisem metod reprodukce těchto jedinců za účelem získání povodní populace dárce zárodečných kmenových buněk. Kapr obecný je jedním z nejdůležitějších druhů akvakultury a také důležitým modelovým druhem, uplatnění těchto postupů výrazným způsobem rozšiřuje možnosti základního i aplikovaného výzkumu nebo ochrany a uchovávání genových zdrojů.

Pro uchování genových zdrojů nebo experimentálních linií *in vitro* se v současné době nabízí především uchovávání kryokonzerovaného spermatu a pro kompletní obnovu těchto linií z uchovávaných dávek spermatu je pak potřeba držet či nějakým způsobem získat jedince samičího pohlaví. Transplantace zárodečných buněk kapra do těla karasa představuje alternativní způsob uchování genových zdrojů nebo experimentálních linií *in vivo*, kdy dochází k výrazné redukci prostoru potřebného pro odchov. Publikované postupy a poznatky rozšiřují možnosti využití kapra jako modelového druhu a v kombinaci s kryokonzervací zárodečných buněk i uchovávání genových zdrojů *in vitro*.

6. 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 zák. 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 nakládání s genovými zdroji.

Předložená metodika detailně popisuje veškeré postupy transplantace zárodečných buněk kapra do juvenilních jedinců karasa, odchov jedinců po transplantaci a zkušenosti s reprodukcí těchto jedinců. Použitím postupů publikovaných v předkládané metodice lze zefektivnit procesy uchovávání genových zdrojů, šlechtění nebo vytváření isogenních linií ryb. Detailní popis manipulačních a mikroinjekčních technik poskytuje informace nutné pro úvahy o využití těchto technik v praxi.

Současným problémem, který může omezit využití stávajících genetických zdrojů ryb, stejně jako novošlechtěných a introdukovaných plemen ryb v rodičovských, prarodičovských, testovacích a užitkových chovech na celém území ČR, je výskyt nebezpečných nákaz ryb – u kapra to jsou virové nákazy jako koi herpesviróza (KHV), jarní virémie kaprů (SCV) nebo spavá nemoc koi kaprů (KSD/CEV). Státní veterinární správa provádí od roku 1998 na území České republiky cílený dozor zaměřený na KHV, jehož cílem je sledovat výskyt nákazy a v případě výskytu účinně nákazu tlumit. Pokud se onemocnění v chovu prokáže, je nařízeno ryby utratit a neškodně odstranit, přičemž nemusí jít pouze o infikovaný druh, ale i o další na místě chované druhy jako potenciální přenašeče. I přes snahu držet genové zdroje ryb alespoň ve dvou chovech může při vyhlášení ohniska nákazy v jednom z chovů dojít k totální likvidaci genového zdroje nebo dalších populace ryb, které jsou výsledkem šlechtění.

Uchovávání genových zdrojů pomocí dříve popsané kryokonzervace zárodečných buněk (Franěk a kol., 2021) společně s postupem publikovaným v této metodice má potenciál rozšířit postupy uchovávání genových zdrojů a jejich obnovy pomocí náhradního rodičovství.

7. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V metodice popsané postupy je možné v praxi aplikovat v případě spolupráce rybářského podniku s institucí, která je vybavena odpovídajícím způsobem pro transplantace zárodečných buněk, a v ideálním případě i pro uchovávání zárodečných buněk v tekutém dusíku. Všechny postupy byly optimalizovány s cílem snížit náklady na provedení a dosáhnout dostatečné efektivity. Náklady spojené s transplantací zárodečných buněk do náhradních rodičů a odchov náhradních rodičů za účelem reprodukce a obnovy původní populace představují jen zlomek nákladů spojených se soustavným udržováním linie začleněné do genových zdrojů *in situ* nebo zlomek nákladů vynaložených na šlechtění pro produkci využívané linie.

Transplantace zárodečných buněk a reprodukce náhradních rodičů představuje v souhrnu technologii náročnou nejen na vybavení, ale i prostory pro odchov náhradních rodičů a následně získaného potomstva. Nutnost odpovídajícího zázemí laboratoře (mikroskopické vybavení, injektor, mikromanipulátor, centrifuga, inkubátory atd.) prakticky vylučuje realizaci postupů samotným rybářským podnikem.

Technologie transplantace zárodečných buněk nenahradí držení genových zdrojů *in situ*, má však potenciál rozšířit možnosti uchovávání genových zdrojů *in vitro* a společně s uchováváním zárodečných buněk v tekutém dusíku může významným způsobem rozšířit možnosti uchovávání genových zdrojů, výsledků šlechtitelské práce nebo populací s potenciálem pro další šlechtění. Využití zmrazovaného spermatu v případě ztráty významné populace má totiž velmi omezené uplatnění. Výsledky našich experimentů publikované v rámci této metodiky však ukazují, že produkce gamet kapra prostřednictvím zlatých karasů je možné dosáhnout po 3 letech odchovu náhradních rodičů. Uchovávání genových zdrojů, pro produkci důležitých linií nebo linií pro další šlechtění formou odchovu tzv. náhradních rodičů tak představuje efektivní způsob uchovávání genových zdrojů v kontrolovaných podmínkách a jako alternativní postup uchovávání genových zdrojů může ochránit náklady v řádu statisíců až milionů korun, doposud vložené do uchovávání genových zdrojů nebo šlechtění nových linií kapra.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Balon, E.K., 1995. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture* 129: 3–48.
- Braat, A., Speksnijder, J.E., Zivkovic, D., 1999. Germ line development in fishes. *The International journal of developmental biology* 43: 745–760.
- Crooijmans, R.P.M. a, Bierbooms, V. a F., Komen, J., Poel, J.J. Van Der, Groenen, 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., Šlechtová, V., Šlechtá, V., 1999:. Genetic resources of commercially important fish species in the Czech Republic: Present state and future strategy. Special edition *Genetics in Aquaculture VI*, *Aquaculture* 173: 471 - 483.
- 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*, 23 s.
- Franěk, R., Marinović, Z., Lujić, J., Urbányi, B., Fučíková, M., Kašpar, V., Pšenička, M., Horváth, Á., 2019a. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. *PLoS ONE* 14(4): e0205481.
- Franěk, R., Tichopád, T., Steinbach, C., Xie, X., Lujić, J., Marinović, Z., Horváth, Á., Kašpar, V., Pšenička, M., Lujić, J., Horváth, Á., Pšenička, M., 2019b. Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation. *Cryobiology* 87: 78–85.
- Gela, D., Kocour, M., Flajšhans, M., Rodina, M., Beránková, P. a Linhart, O., 2009. Technologie řízení reprodukce kapra obecného (*Cyprinus carpio*). *Edice Metodik FROV JU, č. 99*, 43 s.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2007. Production of Trout Offspring from Triploid Salmon Parents. *Science* 317: 15–17.

- 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.
- Pokorný, J., Flajšhans, M., Hartvich, P., Kvasnička, P., Pružina, I., 1995: Atlas kaprů chovaných v České republice. Victoria Publishing, Praha, 69 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.
- Sullivan-Brown, J., Bisher, M.E., Burdine, R.D., 2011. Embedding, serial sectioning and staining of zebrafish embryos using JB-4 resin. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.165>
- 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.
- Yamaha, E., Kazama-Wakabayashi, M., Otani, S., Fujimoto, T., Arai, K., 2001. Germ-line chimera by lower-part blastoderm transplantation between diploid goldfish and triploid crucian carp. *Genetica* 111, 227–236.
- 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.
- 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.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Franěk, R., Kašpar, V., Shah, MA., Gela, D., Pšenička, M., 2021. Production of common carp donor-derived offspring from goldfish surrogates. *Aquaculture* 534, 736252.
- Franěk, R., Marinović, Z., Lujić, J., Urbányi, B., Fučíková, M., Kašpar, V., Pšenička, M., Horváth, Á., 2019. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. *PLoS ONE* 14(4): e0205481.
- Franěk, R., Tichopád, T., Steinbach, C., Xie, X., Lujić, 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.
- Franěk, R., Pšenička, M., 20202021. Metody stabilní produkce diploidních gamet pomocí náhradních rodičů pro účely triploidizace v akvakultuře. *Technologie, FROV JU Vodňany*, č. 182, 30 s.
- Franěk, R., Kašpar, V., Pšenička, M., 2021. Zmrazování zárodečných buněk kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a jejich využití k transplantaci do náhradních rodičů pro účely reprodukce. *Edice metodik, FROV JU Vodňany*, č. 178, 27 s.

Dedikace

Výsledky byly získány za 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 NAZV QK1910428 Uchovávání genetických zdrojů kapra obecného in vitro a tvorba isogenních linií pomocí transplantace zárodečných buněk – 50 %.

Externí odborný oponent

doc. Ing. Radovan Kopp, Ph.D.

Mendelova univerzita v Brně, Oddělení rybářství a hydrobiologie, Zemědělská 1, 613 00 Brno, www.mendelu.cz

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. Štěpánka Scháňková, Ph.D.

Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Oddělení rybářství a včelařství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. ze dne

vydalo Ministerstvo zemědělství ČR, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Oddělení rybářství a včelařství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Adresa autorského kolektivu

Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D. 40%

doc. Ing. Martin Pšenička, Ph.D. 20 %

Ing. Roman Franěk, Ph.D. 40 %

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: dr. hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.; redakce: Zuzana Dvořáková; náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2022; vytištěna v roce 2022; grafický design a technická realizace:.