

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Diplomová práce

**Kryoprezervace a transplantace spermatogonií  
kapra obecného**

**Autor:** Bc. Michaela Fučíková

**Vedoucí diplomové práce:** doc. Ing. Martin Pšenička, Ph.D.

**Konzultant diplomové práce:** Ing. Roman Franěk

**Studijní program:** Zemědělská specializace N4106

**Studijní obor:** Rybářství a ochrana vod 4106T040

**Forma studia:** Kombinovaná

**Ročník:** 2.

České Budějovice, 2018

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne .....

Podpis studenta .....

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Martinovi Pšeničkovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Romanu Fraňkovi za odborné vedení a cenné rady při vypracování této práce. Poděkování patří i mé rodině a příteli za podporu, kterou mi během studia poskytovali.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta rybářství a ochrany vod

Akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela FUČÍKOVÁ**  
Osobní číslo: **V16N016K**  
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**  
Studijní obor: **Rybářství a ochrana vod**  
Název tématu: **Kryoprezervace a transplantace spermatogonií kapra obecného**  
Zadávající katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

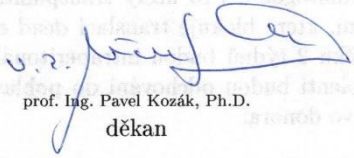
Bylo prokázáno, že lze využít potenciálu zárodečných kmenových buněk pro indukcii chimér zárodečné linie prostřednictvím jejich transplantace do organismu recipienta, ve kterém jsou tyto buňky schopny proliferovat a následně produkovat gamety donora. Pravděpodobně neefektivnějším způsobem pro generaci chimér je transplantace spermatogonií do larev recipientů. Tato technologie byla zatím aplikována pouze u několika druhů ryb, což dává značný prostor pro rozšíření informací o možnostech náhradní reprodukce, která by v budoucnu mohla být aplikována ve větším měřítku. Získání zárodečných buněk pro transplantaci se bohužel neobejde bez usmrcení jedince, kdy je obvykle získáno velké množství testikulární tkáně obsahující spermatogonie. Pro samotnou transplantaci obvykle postačí velmi malý zlomek z celkového množství tkáně. Nevyužitá část může být efektivně uchována prostřednictvím kryokonzervace a následně v budoucnosti použita pro další transplantace. Tímto postupem lze dlouhodobě uchovat nejen paternální genetickou informaci, jak je tomu v případě kryoprezervace spermií, ale také maternální genetickou informaci (např. mtDNA), kterou jinými způsoby u ryb dlouhodobě uchovat nelze.

Cílem diplomové práce bude vytvořit nejvhodnější protokol pro zamrazování spermatogonií našeho komerčně důležitého druhu ryby, kapra obecného, a následně ověřit možnost produkce kapřích gamet prostřednictvím transplantace spermatogonií do náhradních rodičů karase zlatého.


Metodický postup se bude skládat z testování různých kryoprotektantů o několika koncentracích při různých rychlostech mrazení na přežití spermatogonií. Pro účely transplantace budou jikry karase zlatého mikroinjikovány morpholinem, které blokuje translaci *dead end* genu, čímž dojde k jejich sterilizaci. Do recipientů ve věku 2 týdnů budou intraperitoneálně transplantovány kryoprezervované spermatogonie. Recipienti budou odchováni do pohlavní dospělosti s cílem získat a identifikovat gamety/potomstvo donora.

Rozsah grafických prací: **1 - 7 grafů/tabulek a 5-15 obrázků či fotek**  
Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70 stran**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Martin Pšenička, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Roman Franěk**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Datum zadání diplomové práce: **11. prosince 2016**  
Termín odevzdání diplomové práce: **4. května 2018**

  
prof. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
děkan

L.S.

  
doc. Ing. Tomáš Randák, Ph.D.  
ředitel

Ve Vodňanech dne 20. dubna 2018

## Příloha zadání diplomové práce

### Seznam odborné literatury:

- Lee, S., Iwasaki, Y., Shikina, S., Yoshizaki, G., 2013. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1640-1645. doi:10.1073/pnas.1218468110
- Lee, S., Yoshizaki, G., 2016. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology* 72, 165-168. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.01.004
- Marinović, Z., Lujić, 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. *Gen. Comp. Endocrinol.* doi:10.1016/j.ygcen.2016.07.005
- Okutsu, T., Shikina, S., Sakamoto, T., Mochizuki, M., Yoshizaki, G., 2015. Successful production of functional Y eggs derived from spermatogonia transplanted into female recipients and subsequent production of YY supermales in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 446, 298-302. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.05.020
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2006a. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2725-2729. doi:10.1073/pnas.0509218103
- Okutsu, T., Yano, A., Nagasawa, K., Shikina, S., Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2006b. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J. Reprod. Dev.* 52, 685-693. doi:10.1262/jrd.18096
- Pšenička, M., Saito, T., Linhartová, Z., Gazo, I., 2015. Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology* 83, 1085-1092. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.12.010
- 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 (2), 119-122.
- Robles, V., Riesco, M.F., Psenicka, M., Saito, T., Valcarce, D.G., Cabrita, E., Herráez, P., 2015. Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. *Aquaculture*. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.004
- Takeuchi, Y., 2003. Generation of Live Fry from Intraperitoneally Transplanted Primordial Germ Cells in Rainbow Trout. *Biol. Reprod.* 69, 1142-1149. doi:10.1095/biolreprod.103.017624
- Yamaha, E., Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., 2007. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. *J. Sea Res.* 58, 8-22. doi:10.1016/j.seares.2007.02.003

## Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	10
2.1	Gametogeneze.....	10
2.1.1	Zárodečné kmenové buňky .....	10
2.1.2	Specifikace zárodečných buněk .....	10
2.1.3	Migrace PGC.....	12
2.1.4	Spermatogonie a oogonie .....	13
2.2	Transplantace .....	17
2.2.1	Metody transplantace .....	20
2.2.2	Sterilizace recipienta .....	23
2.2.3	Chiméry zárodečné linie .....	25
2.2.4	Reprodukce metodou náhradních rodičů .....	26
2.3	Kryoprezervace .....	26
2.3.1	Kryoprotektanty .....	28
2.3.2	Kryoprezervace spermatogonií a oogonií .....	28
2.3.3	Prespektivy využití kryoprezervace .....	29
3	Materiál a metodika.....	30
3.1	Získání testikulární tkáně.....	30
3.2.	Kryoprezervace .....	31
3.2.1	Kryoprotektanty .....	31
3.2.2	Koncentrace kryoprotektantu a rychlost zamrazování .....	31
3.2.3	Velikost tkáně a doba ekvilibrace .....	31
3.2.4	Cukry.....	31
3.3.	Transplantace .....	32
3.3.1	Příprava recipientů .....	32

3.3.2	Transplantace .....	32
3.3.3	Identifikace chimér zárodečné linie .....	33
3.4	Statistické vyhodnocení dat .....	33
4	Výsledky .....	34
5	Diskuse .....	40
6	Závěr .....	44
7	Seznam použité literatury .....	45
8	Přílohy .....	55
9	Abstrakt .....	58
10	Abstract .....	59



# 1 Úvod

Kapr obecný (*Cyprinus carpio*) patří v celosvětové akvakultuře mezi jeden z nejvíce chovaných druhů (FAO, 2016). V České republice je kapr bezkonkurenčně nejčastěji chovaným druhem, podle statistik bylo v roce 2016 v rámci České republiky vyprodukováno 18 362 tun kapra (Rybářské sdružení České republiky, 2016). Napříč chovy kapra nalézáme mnoho tradičních i nově vzniklých plemen, která jsou adaptovaná různým podmínkách a tím zefektivňují akvakulturu (Gorda a kol., 1995). S roztoucím množstvím plemen ovšem rostou i nároky na prostor, zvyšuje se riziko přenosu chorob a vzrůstá riziko inbreedingu, který je důsledkem rozmnožování příbuzných jedinců v chovaných populacích. Pro zachování plemen s dostatečnou genetickou variabilitou je důležité dodržovat správné šlechtitelské postupy a nakládání s genetickými zdroji. Genetickým zdrojem mohou být generační ryby chované *ex situ*, *in situ*, nebo například spermie dlouhodobě uchovávané metodou kryoprezervace v tekutém dusíku, což je již nyní v praxi běžným postupem (Flajšhans, 2013). Můžeme tak mít genetický zdroj každého plemena/linie uložený v kryobance a v případě potřeby lze provést rozmrazení spermií, které jsou následně použity znovu k obnově plemena/linie.

Kryoprezervaci lze rozdělit na dva druhy, pomalé zmrazování a rychlé zmrazování nazývané vitrifikace (Xin a kol., 2017), které je spíše využíváno při zamrazování embryí (Higaki a kol., 2010), nebo tkání (Lee a kol., 2013). Existuje několik publikací a postupů popisujících pomalé zamrazování spermií kapra (Babiak a kol. 1997; Linhart a kol., 2000) a vitrifikaci spermií (Bozkurt a kol., 2014). Alternativou uchování spermií je kryoprezervace zárodečných buněk – prekurzorů gamet. Ta byla doposud úspěšně popsána jen u několika málo druhů ryb, včetně jejich následné transplantace a produkce potomstva prostřednictvím náhradních rodičů. Jako příklad úspěšné kryoprezervace zárodečných buněk u ryb lze uvést kryoprezervaci spermatogonií kriticky ohroženého druhu lenoka sibiřského (*Brachymystax lenok*) (Lee a Yoshizaki, 2016), nebo zmrazování primordiálních zárodečných buněk u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Kobayashi a kol., 2003; Kobayashi a kol., 2007). Ovšem zamrazování zárodečných buněk kapra nebylo doposud zpracováno. Cílem této diplomové práce bylo vytvořit protokol pro zamrazování spermatogonií našeho komerčně důležitého druhu, kapra obecného a následně transplantovat rozmrazené spermatogonie kapra do larev náhradních rodičů, v případě této práce do karase zlatého (*Carassius auratus*).

## 2 Literární přehled

### 2.1 Gametogeneze

#### 2.1.1 Zárodečné kmenové buňky

U ryb, jako i u ostatních živočichů, nalézáme dvě buněčné linie, somatickou a zárodečnou. Obě tyto buněčné linie se uplatňují již na samotném začátku embryonálního vývoje, ale obě s jinou funkcí. Somatická linie je odpovědná za vznik těla jedince, linie zárodečná je odpovědná za vznik gamet přenášejících genetickou informaci do dalších generací. Zárodečné buňky dokáží jako jediné generovat zcela nový organismus a jejich prekurzory jsou nazývány primordiální zárodečné buňky (PGC). Ve srovnání se somatickými buňkami jsou PGC kulatého tvaru, větší velikosti a obsahují velké jádro, zároveň je pro ně typická tzv. zárodečná plasma, ve které jsou volně rozmístěny ribozomy a která je vysoce elektrodenzní (Herpin a kol., 2007; Koç a Yüce, 2012). Zárodečná plasma je během oogeneze lokalizována ve vegetativním pólu oocyty, jakmile dojde k oplození a započne časná embryogeneze, začíná se zárodečná plasma přemísťovat do oblasti dělicích rýh embrya (Braat a kol., 1999; Kosaka a kol., 2007). PGC jsou odpovědné za vznik samčích a samičích pohlavních buněk (gamet), spermií a oocytů v procesu nazývaném gametogeneze (Yoshizaki a kol., 2003, 2002). Proces gametogeneze začíná specifikací a migrací PGC. Na začátku embryonálního vývoje nejprve dochází ke specifikaci PGC od linie somatické, v této chvíli mohou být PGC nazývány jako presumptivní zárodečné buňky (pPGC), ze kterých se stávají plnohodnotné PGC, jenž dokáží kontrolovat své základní funkce jako je transkripce, translace, stabilita RNA proteinů a reakci na podněty pro následnou diferenciaci. I tyto zmíněné vlastnosti přispívají ke schopnosti PGC vyhnout se diferenciaci v somatické buňky a zůstat tak buňkami zárodečnými. Po specifikaci PGC dojde k jejich migraci z původního místa vzniku do místa určení, jímž je v budoucnu takzvaná zárodečná rýha. Samotná migrace začíná již během časného embryonálního vývoje. U kostnatých ryb migrují prekurzory PGC ve směru z vegetativního pólu embrya k pólu animálnímu, kde později, v marginální části blastodisku, dávají za vznik plnohodnotným PGC (Raz, 2003).

#### 2.1.2 Specifikace zárodečných buněk

Již během časného embryonálního vývoje musí dojít k oddělení linie zárodečných buněk od linie somatické. Tento proces se nazývá specifikace zárodečných buněk a vede ke vzniku PGC, které v dalším vývoji dávají za vznik zárodečné linii a v poslední řadě

i gametám (Santos a Lehmann, 2004). Napříč druhy jsou popsány dva mechanismy specifikace PGC. První je mechanismus závislý na zárodečné plasmě a druhý je mechanismus odvíjející se od epigenetických faktorů. Ten nalézáme u ocasatých, savců a ptáků (Braat a kol., 1999; Yön a Akbulut, 2015). U kostnatých ryb (Teleostei) byla specifikace PGC popsána u několika druhů, například u medaky japonské (*Oryzias latipes*) (Herpin a kol., 2007), u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) (Marlow, 2015), piskoře dálnovýchodního (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Fujimoto a kol., 2006), nebo u lososa obecného (*Salmo salar*) (Nagasawa a kol., 2013). U ryb se uplatňuje první mechanismus specifikace a to díky, již zmíněné, zárodečné plasmě, ve které je uloženo velké množství důležitých RNA komponentů a proteinů (Yoshizaki a kol., 2002).

Jako nejznámější RNA komponenty v zárodečné plasmě, můžeme zmínit dva RNA transkripty, *nanos* a *vasa*. *Vasa* mRNA je ATP dependentní RNA helikáza z rodiny DEAD-box exprimovaná v PGC (Braat a kol., 1999). Prvotní identifikaci tohoto molekulárního markeru provedl Jongens a kol. u *Drosophily* (Jongens a kol., 1994) a u ryb, konkrétně dánia pruhovaného, pak Yoon a kol. (1997). Stejně jako u *Drosophily* a mnoha ostatních živočichů, u kostnatých ryb je *vasa* mRNA maternálně děděná a exprimovaná v zárodečné linii během celého vývoje jedince (Raz, 2003). Druhý důležitý komponent zárodečné plasmy je zmíněný RNA transkript *nanos*, který je důležitý pro časný vývoj PGC v organismu (Draper a kol., 2007). Oba tyto transkripty mohou sloužit jako molekulární markery pro detekci PGC (Yön a Akbulut, 2015).

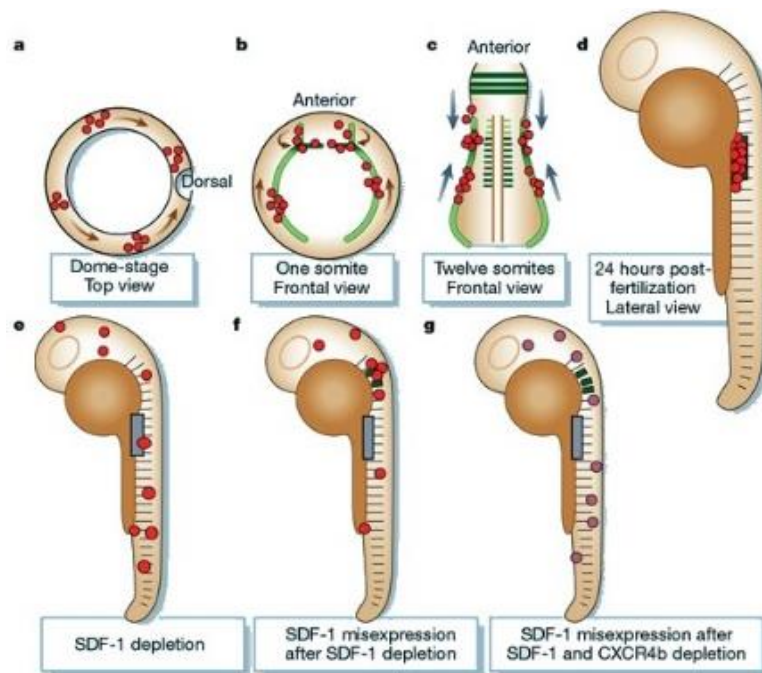
Jako první protein byl v zárodečné plasmě identifikován *dead end (dnd)*. Jedná se o kódující RNA-vázající protein klíčový pro správnou migraci, vývoj a přežití PGC (Hong a kol., 2016; Gross-Thebing a kol., 2017). *Dnd* zároveň zabraňuje diferenciaci PGC v jiný typ buněk, než jsou buňky zárodečné. Pokud totiž dojde k zablokování exprese tohoto proteinu (knockdown), tak PGC ztrácejí jejich charakteristické morfologické znaky a nejsou schopny dále projevovat vlastnosti zárodečných buněk, jako je migrace, což nakonec vede k jejich úplnému zániku (Gross-Thebing a kol., 2017). K expresi *dnd* genu dochází krátce po oplození jikry spermií, v následujícím stádiu jedné buňky jsou již přítomny granule maternálního *dnd* RNA, které jsou rozmístěny po celém obsahu embrya. Během dalšího stádia se začínají granule *dnd* proteinu postupně přesouvat z animálního pólu a koncentrují se ve vegetativní části blastomery. Stejný způsob exprese nalézáme i u *vasa* RNA (Weidinger a kol., 2003).

### 2.1.3 Migrace PGC

Pro vznik funkčních gamet musí PGC dosáhnout místa budoucí gonády, jímž je zárodečná rýha. Pro dosažení tohoto specifického místa je nutná migrace PGC přes tkáň během raných fází embryonálního vývoje (Braat a kol., 1999). Proces migrace byl popsán u *Drosophily* (Santos a Lehmann, 2004), kuřete (Motono a kol., 2008), myši (Saitou, 2009) a dánia pruhovaného (Weidinger a kol., 2002). Byly tím zjištěny dva typy migrace PGC. První prostřednictvím krevního oběhu (u ptáků) a druhý podél střeva, který se uplatňuje u všech ostatních zkoumaných organismů (Xu a kol., 2010). Při migraci PGC hraje roli mnoho faktorů, které ovlivňují její úspěšnost. Jedním z důležitých genů (lokalizovaný v zárodečné plazmě) nutných pro správný průběh migrace je výše uvedený *dnd* gen (Molyneaux a Wylie, 2004). Nezbytnost *dnd* genu pro migraci PGC byla demonstrována u několika druhů ryb, například u medaky japonské (Hong a kol., 2016), jesetera čínského (*Acipenser sinensis*) (Yang a kol., 2015), lososa obecného, u kterého byl proveden tzv. knockout genu na úrovni DNA. Ten měl za následek nenávratnou nefunkčnost *dnd* genu a sterilitu ošetřených jedinců (Wargelius a kol., 2016), nebo u piskoře dálnovýchodního (Fujimoto a kol., 2010), kde knockdown *dnd* genu na úrovni mRNA vedl k blokaci migrace PGC (Kedde a kol., 2007).

Migraci PGC lze dobře popsat na příkladu dánia pruhovaného (viz obr. 1), pro které platí model migrace podél střeva (Xu a kol., 2010). Migrace PGC začíná ve stádiu blastuly (3 hodiny po oplození) a to díky chemokininovým signálům. Nejdříve se vytváří 4 shluky (klastry) PGC, které migrují směrem k dorsální středové linii embrya. Jakmile se embryo dostává do stádia somitogeneze (10–18 hodin po oplození), dochází k silné expresi chemokininu *Sdf1* v místě u prvního tělního segmentu. Chemokinin *Sdf1* a jeho receptor *CXCR4b* tak hrají klíčovou roli pro spuštění migrace PGC. Ty pak migrují právě směrem do míst s vyšší hodnotou exprimovaného *Sdf1* a kolonizují tak zárodečnou rýhu embrya (Robles a kol., 2017; Yön a Akbulut, 2015).

Jakmile proběhne specifikace PGC a díky migraci dorazí PGC do místa zárodečné rýhy, migrace se zastaví a dojde k asociaci se somatickými buňkami gonád. Zde, z důvodu specifické interakce mezi PGC, somaticky regulovaným sex-specifickým vývojem a diferenciací, vznikají spermatogoniální, nebo oogoniální kmenové buňky odpovědné za vznik funkčních gamet. PGC tímto naplňují funkci zárodečných buněk (Richardson a Lehmann 2015; Santos a Lehmann 2004).



Obrázek 1: a-d) Normální migrace PGC (červené tečky) podle výsledků Doitsidou a kol., 2002 a Knaut a kol., 2003. (a) čtyři shluky PGC pocházející z náhodných míst podél okrajů embrya a migrující směrem k dorsální středové linii. (b) Na začátku somitogeneze (formování segmentů), SDF-1 RNA (zeleně) je silně exprimováno blízko prvního segmentu a právě sem PGC směřují. (c) Během somitogeneze se čtyři shluky PGC pohybují směrem k místu s vyššími hodnotami SDF-1. (d) Na konci embryonálního vývoje PGC asociují s buňkami exprimující SDF-1 v místě budoucích gonád (zelený pruh). (e–g) studie SDF-1 a příslušného receptoru CXCR4b. (e) po tom co je SDF-1 vyčerpáno (modro-šedý pruh) se zárodečné buňky rozptýlí po celém embryu. (f) Následně exprimování SDF-1 na jiném místě láká PGC na novou pozici. (g) PGC, které vyčerpaly CXCR4b (fialově) již nemigrují směrem k SDF-1, které je exprimováno na nové pozici. Převzato a upraveno podle Kunwar a Lehmann, 2003

## 2.1.4 Spermatogonie a ogonie

### 2.1.4.1 Spermatogonie

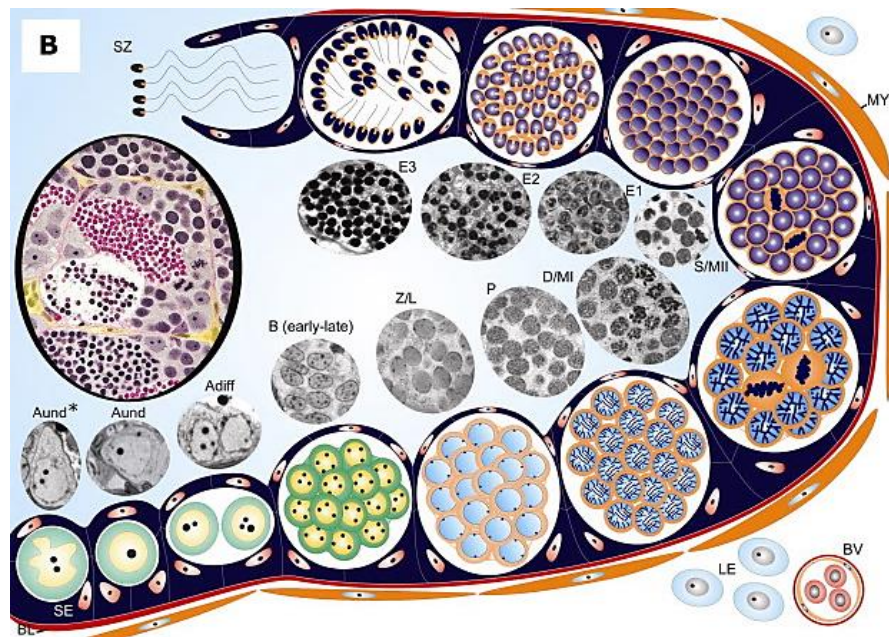
Spermatogonie neboli buňky samčí zárodečné linie gonád jsou odvozeny od PGC a v postupném vývoji, nazývaném spermatogeneze, dávají za vznik spermii. Spermatogeneze je vysoce organizovaný proces, zahrnující mitózu a meiózu. Spermatogonie jsou unikátní buňky, které se dokáží reprogramovat v pluripotentní buňky, schopné diferenciovat i v buňky somatické (Lacerda a kol., 2014).

Strukturu testikulárního epitelu můžeme rozlišit na dva typy, lobulární a tubulární. Tubulární typ najdeme například u živorodky duhové a je charakterizován velkou dutinou

uloženou v *testes*. Kolem této dutiny se nacházejí tubuly, v jejichž vrcholech jsou zárodečné buňky a nediferenciované spermatogonie. Časná stádia těchto spermatogonií pak vytváří zmíněné cysty, které v průběhu spermatogeneze sestupují do středu *testes*. Druhým typem je pak lobulární struktura testikulárního epitelu (Billard, 1986). U ryb, stejně jako u ostatních obratlovců, probíhá spermatogeneze, v již zmíněných cystách. Tyto cysty se vytváří, když jsou nediferenciované spermatogonie vyvinuté z PGC, označovány jako  $A_{und}$ , úplně obklopeny Sertoliho buňkami, které jsou pro vývoj a přežití spermatogonií velmi důležité (Schulz a kol., 2010; Schulz 2002; McClusky, 2012).

Spermatogonie lze rozlišit na dva základní typy (viz obr. 2), první jsou spermatogonie A. Jedná se o největší buňky zárodečného epitelu (12 – 16  $\mu\text{m}$ ). Jsou to diploidní kmenové buňky, které mitoticky proliferují. Obsahují světlou granulární cytoplasmu a centrálně uložené jádro s chromatinem. Spermatogonie A mají dva odlišné fenotypy - nediferenciované spermatogoniální kmenové buňky značené  $A_{und}$  a již diferenciované spermatogonie  $A_{diff}$  předurčené k mitotické proliferaci vedoucí k meióze (Okutsu a kol., 2006a; Uribe a kol., 2014).

U spermatogonií typu B se zvyšuje množství zárodečných buněk v cystě a můžeme rozlišit několik jejich generací. Jádro je kulaté s jedním až dvěma jádérky. Od spermatogonií A se liší především ve velikosti (9 – 12  $\mu\text{m}$ ) a vyšším obsahu heterochromatinu v jádře (Leal a kol., 2009), který u posledního stádia spermatogonií typu B dosahuje maximální hustoty (Lacerda a kol., 2014). Jakmile proběhne poslední mitóza, diferencují spermatogonie B meiózou v primární spermatocyty. Ty se dále vyvíjí v sekundární spermatocyty (Schulz a kol., 2010) a následně ve spermatidy, které již vykazují malé jádro, ovšem s chromatinem, který je zde již vysoce kondenzovaný. V poslední fázi, nazývané spermiogeneze, vznikají ze spermatid funkční spermie s vyvinutým bičíkem, zachovanými mitochondriemi a cytoplasmou (Uribe a kol., 2014).



Obrázek 2: Spermatogeneze u dávnia pruhovaného. Vysvětlivky: (BL) bazální lamina; (SE) Sertoliho buňky; (LE) Leydigovy buňky; (BV) cévy; (MY) myoidní buňky; ( $A_{und*}$ ) nediferencované spermatogonie typu A (kmenové buňky); ( $A_{und}$ ) nediferencované spermatogonie typu A; ( $A_{diff}$ ) diferencované spermatogonie typu A; (B) spermatogonie typu B - časné stádium; (Z/L) leptotenní/zygotenní primární spermatocyt; (P) pachytenní primární spermatocyt; (D/MII) diplotenní spermatocyt v metafázi I; (D/MII) sekundární spermatocyt v metafázi II; (E1) časná spermatida; (E2) středně pokročilá spermatida; (E3) zralá spermatida; (SZ) spermie; Převzato a upraveno podle Schulz a kol., 2010

#### 2.1.4.2 Oogonie

Vznikají komplexním procesem nazývaným oogeneze. Jedná se o souhrn dějů, při kterých se vytvářejí haploidní samičí gamety. Oocyty se vyvíjejí ve vaječnicích (*ovaria*), které se skládají ze dvou buněčných typů, somatických a zárodečných buněk. Somatické buňky se uplatňují při vytváření ovariální kapsule, intersticiální tkáně a ovariálních folikulů. Buňky zárodečné mají naopak vliv při formování vlastního oocyty (Kagawa, 2013; Lubzens a kol., 2010).

Zárodečné buňky zahrnují diploidní oogonie (jádro obsahuje dvě sady chromozomů, nazývaných homologní), derivované z primordiálních zárodečných buněk a oocyty diferencované ze zmíněných diploidních oogonií díky prvnímu meiotickému dělení, které následuje po několika již proběhlých mitotických děleních. Vyvíjející se oocyty posléze začínají být obklopeny folikulární vrstvou, skládající se z morfoloicky stejných

buněk, s výjimkou vysoce specializovaných buněk tvořících v budoucnu mikropyle a vnější vrstvou folikulárního obalu (théka), tvořeného fibroblasty, kolagenovými vlákny, krevními cévami a buňkami produkujícími steroidy (Kagawa, 2013; Lubzens a kol., 2010). Proces oogeneze můžeme, podle morfologických a fyziologických charakteristik, rozdělit do několika fází. Fáze proliferace, primárního růstu (previtelogeneze), sekundárního růstu (vitelogeneze) a fáze maturace (viz obr. 3).

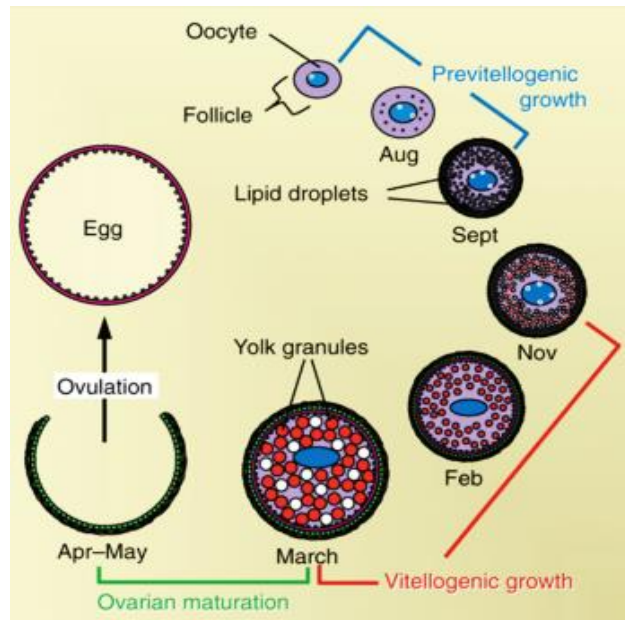
Fáze proliferace nastává po transformaci PGC v oogonie, jejichž počet se zvyšuje díky mitotickému dělení. Jakmile proběhne mitotická fáze proliferace oogonií, se oogonie mění v tzv. primární oocyt. Proliferace oogonií je ovlivňována sex steroidy, které zároveň podporují i následné první meiotické dělení vedoucí k fázi primárního růstu (Lubzens a kol., 2010). Následuje previtelogenní fáze neboli období primárního růstu. Na konci této fáze již oocyt obsahuje všechny molekuly a orgány nezbytné pro endocytotické a exocytotické děje následující fáze vitelogeneze a je obklopen několika vrstvami vytvářejícími théku (Le Menn, Cerdà a Babin 2007).

Během třetí fáze – vitelogeneze – dochází ke zvětšování ovariálního folikulu. Jádro zůstává ve stádiu diplotene a akumuluje žloutek obsahující nutriční rezervy z krve nezbytné pro následující vývoj embrya. Vývoj ovariálního folikulu je v této fázi kontrolován dvěma hlavními environmentálními faktory – fotoperiodou a teplotou. Reakcí na zmíněné faktory je spuštění kaskády neurohormonů vedoucí k sekreci GnRH (gonadotropní hormon), což je hormon, díky němuž dochází k sekreci dalšího důležitého hormonu FSH (folikulostimulační hormon). FSH signály, řízené specifickými receptory lokalizovanými na théce a granulozních buňkách, spouštějí syntézu steroidních hormonů, jako je například 17  $\beta$ -estradiol (E2). E2, který je sekretován do krevního řečiště, ovlivňuje syntézu vitelogenních hormonů, hlavních žloutkových prekurzorů v plasmě (Le Menn, Cerdà a Babin, 2007; Hara, Hiramatsu a Fujita, 2016). Na konci vitelogeneze se ve vaječnicích již nachází žloutkem naplněné primární oocyty, které posléze podstoupí maturaci a ovulaci (Reading, Sullivan a Schilling 2017; Jalabert 2005).

Jako poslední nastupuje fáze maturace. Nyní již primární oocyt opouští fázi diplotene a znovu zahajuje první meiotické dělení. Celý tento proces je spuštěn gonadotropními hormony vyskytujícími se v ooplasmě a jádře. Jádro oocytu migruje během této fáze k animálnímu pólu. Jakmile se oocyt nachází v metafázi prvního meiotického dělení, tak vznikají dvě buňky – velký sekundární oocyt a malé primární pólóvé tělíčko, které posléze



degraduje, zatímco sekundární oocyt podléhá druhému meiotickému dělení a během ovulace se odděluje od somatických vrstev. Druhé meiotické dělení pokračuje až do metafáze II., kde dochází k pauze ve vývoji až do oplození spermií, které znovu aktivuje proces konce metafáze II. Výsledkem je vznik stádia nazvané *ovum* a druhého pólóvého tělíška, které odchází ihned po oplození (Le Menn a kol., 2007).



Obrázek 3: Model oogeneze na příkladu okouna bílého (*Morone americana*). Oocyt spolu se somatickými tkáněmi (granulózní b. a théka) se nazývá folikul. Během previtelogenní fáze oocyt akumuluje lipidy. Další fází je vitelogenenní růst, při kterém pokračuje ukládání lipidů a zároveň i proteinů žloutku. Po vitelogenezi podstupuje oocyt maturaci, během které znovu probíhá meióza. Výsledkem je vajíčko schopné oplození. Převzato a upraveno podle Reading a kol., 2017

## 2.2 Transplantace

Pojmem transplantace rozumíme proces přenosu buněk, tkání, nebo celých orgánů, z vhodně zvoleného dárce do daného recipienta. Transplantace můžeme rozdělit na několik typů. Při transplantaci od dárce, geneticky identického s recipientem (například imbrední linie, jednovaječná dvojčata), hovoříme o transplantaci syngenní. Druhým typem je transplantace buněk od geneticky neidentického jedince, ale z téhož živočišného druhu nazývaná alogenní. Poslední možností je transplantace mezi jedinci odlišných druhů, nazývaná transplantace xenogenní (Hořejší & Bartůňková, 2009).

Alogenní transplantace. Tento typ transplantace, mezi jedinci stejného druhu provedl Okutsu v roce 2006, kdy transplantoval testikulární zárodečné buňky, obsahující

spermatogonie, z dospělého jedince pstruha duhového, do čerstvě vykulených larev pstruha duhového (Okutsu a kol., 2006a). U komerčně důležitého druhu tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) popsal transplantaci Lacerda a prokázal tak, že transplantace zárodečných buněk v rámci druhu je úspěšná (Lacerda a kol., 2006). Dalším příkladem alogenní transplantace spermatogonií může být experiment z roku 2012, který u kranase japonského (*Seriola quinqueradiata*) provedl Morita a kol., (Morita a kol., 2012).

Xenogenní transplantaci se u ryb věnoval například Okutsu a kol., který v roce 2008 transplantoval spermatogonie pstruha duhového do peritoneální dutiny vykulených sterilních triploidních embryí lososa masu (*Oncorhynchus masou*) (Okutsu a kol., 2008). Navázal tak na experiment z roku 2004, při kterém Takeuchi a kol., transplantovali PGC izolované z genitální rýhy čerstvě vykulených embryí pstruha duhového, do peritoneální dutiny čerstvě vykulených embryí lososa masu (Takeuchi a kol., 2004).

U všech zmíněných transplantací bylo dosaženo produkce gamet donora, nebo vzniku chimér zárodečné linie. Další experimenty týkající se různých metod transferu zárodečných buněk u ryb spolu s jejich úspěšností, jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 1).

Tabulka 1: Přehled experimentů s různými metodami transplantace zárodečných buněk u ryb mezi zvoleným donorem a recipientem

Recipient	Věk recipienta	Donor	Věk donora	Sterilizace	Metoda transplantace	Úspěšnost	Autoři	Rok
Albino danio pruhované ( <i>Danio rerio</i> )	Midblastula	Wild type danio pruhované ( <i>Danio rerio</i> )	Midblastula	-	Transplantace blastomer	5 z 28 chimér produkovalo potomstvo se znaky donora	Lin a kol.,	1992
Karas obecný ( <i>Carassius carassius</i> )	Midblastula až pozdní blastula	Karas zlatý ( <i>Carrasius auratus</i> )	Embryo	-	Transplantace blastomer	Chiméry produkovaly potomstvo se znaky donora s frekvencí 3,4 až 93,2 %	Yamaha a kol.,	2001
Tilápie nilská ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	4 - 5 měsíců	Tilápie nilská ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	4 - 5 měsíců	Busulfan	Transplantace spermatogonií přes urogenitální papilu	-	Lacerda a kol.,	2006
Pstruh duhový ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Larva 32 – 35 dní po oplození (dpf)	Transgenní pstruh duhový ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	9 měsíců	-	Transplantace spermatogonií	13/26 ♂ a 16/40 ♀ produkovalo gamety se znaky donora	Okutsu a kol.,	2006a
Danio pruhované ( <i>Danio rerio</i> )	Blastula	Danio duhové ( <i>Danio albolineatus</i> )	Somitogeneze (10 - 15 somitů)	Injikace <i>dnd</i> MO	Transplantace PGC	50 % transpl. PGC domigrovalo k zárodečné rýze a posléze produkovalo gamety donora	Saito a kol.,	2008
Danio pruhované ( <i>Danio rerio</i> )	Blastula	Danio pruhované ( <i>Danio rerio</i> )	Blastula	Injikace <i>dnd</i> MO	Transplantace PGC	-	Kawakami a kol.,	2010
Sterilní hybrid danio pruhované X danio duhové	2 týdny	Danio duhové ( <i>Danio albolineatus</i> )	♀ stáří 3 – 5 měsíců	Hybridizace	Transplantace oogonií do břišní dutiny recipienta	12/67 chimér po párování s wild-type dániem produkovalo životaschopné potomstvo	Wong a kol.,	2011
Karas stříbřitý ( <i>Carrasius auratus</i> )	Blastula	Bester (hybrid vyzy velké X jesetera malého)	Somitogeneze	-	Transplantace PGC	2/36 PGC lokalizována v gonádách 3 dpf	Saito a kol.,	2014
Jeseter malý ( <i>Acipenser ruthenus</i> )	Larva (1 týden po vykolení)	Jeseter sibiřský ( <i>Acipenser baerii</i> )	4 roky	-	Transplantace spermatogonií a oogonií	90 dní po transplantaci mělo 60 % recipientů proliferující buňky	Pšenička a kol.,	2015

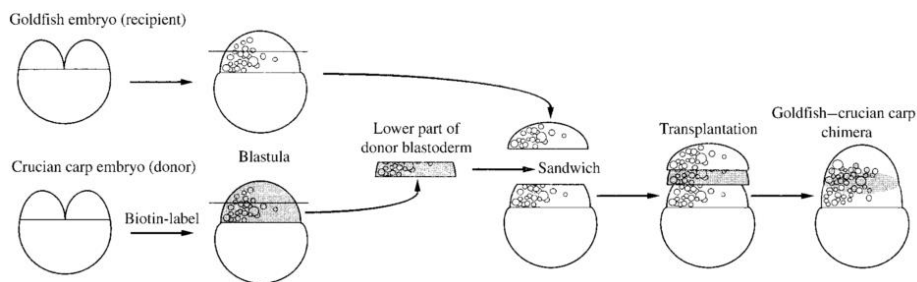
### 2.2.1 Metody transplantace

U ryb bylo popsáno několik způsobů transferu buněk za účelem vytvoření chimér zárodečné linie. Můžeme transplantovat blastomery, izolované PGC, nebo spermatogonie/oogonie (Yamaha a kol., 2007). Úspěšná transplantace zárodečných buněk vede ke vzniku takzvané chiméry zárodečné linie (více viz kapitola 3.2.3. „Chiméra zárodečné linie“). Před každou transplantací je vhodné sterilizovat recipienta, aby nedocházelo k nežádoucí kompetici buněk původních s transplantovanými, což by mohlo negativně ovlivnit výsledek transplantace. Navíc, pokud by sterilizace nebyla provedena, recipient by i nadále produkoval své gamety, které jsou v případě transplantace nežádoucí.

#### 2.2.1.1 Transplantace blastomer

Jedná se o metodu, která může být provedena dvěma způsoby. První možností je nasátí blastomer (obsahující jak PGC, tak somatické buňky) pomocí skleněné kapiláry a mikromanipulátoru, blastomery jsou následně injikovány do dechorionovaného embrya recipienta ve stádiu 1000 buněk. Transplantované blastomery jsou vysoce pluripotentní, což lze sledovat při následném vývoji (Zou a Wei, 2010; Yamaha a kol., 2007; Ho a Kimmel, 1993). Poprvé byla transplantace blastomer provedena u dáňá pruhovaného, kdy byly touto metodou úspěšně vytvořeny chiméry zárodečné linie (Lin a kol., 1992). Bohužel ne vždy je zajištěna úspěšnost této metody, a to z toho důvodu, že ne pokaždé transplantujeme i blastomery obsahující PGC. Může se tedy stát, že transplantované blastomery obsahují pouze somatické buňky, které do buněk zárodečných již diferencovat nedokáží. Transplantace blastomer je možná i mezidruhově. Zde však dochází k problému, kdy vznikají agregáty somatických buněk z transplantovaných blastomer donora, které negativně ovlivňují následnou migraci PGC. Čím více jsou druhy, mezi kterými transplantujeme blastomery, fylogeneticky vzdálenější, tím více vzniká shluků somatických buněk a dochází tak k abnormální podobě embrya (Saito a kol., 2010).

Druhým způsobem transplantace blastomer, kterou provedl Yamaha a kol., je tzv. metoda sandwich (Yamaha a kol., 2001). Jedná se o způsob, při kterém je přenesena celá spodní část blastodermu donora obsahující PGC, ta je vložena mezi dvě části blastodermu recipienta ve stádiu blastuly (obr. 4). Jako donor byl použit *Carassius auratus langsdorfi* a recipientem byl karas zlatý. Jedná se tedy o xenogenní typ transplantace.



Obrázek 4: Schéma „sandwich“ metody transferu blastomer; převzato podle Yamaha a kol., 2001

#### 2.2.1.2 Transplantace PGC

PGC jsou izolovány z embryí donorů a transplantována do embryí recipienta ve stádiu blastuly. Embrya recipienta musí pocházet ze sterilních hybridů, nebo musejí být sterilizována za použití různých metod, při nichž dochází k blokadě vývoje endogenních PGC recipienta. Toho dosáhneme například injikací *dead end* antisense morpholino oligonukleotidu (Lacerda a kol., 2013; Ciruna a kol., 2002), termochemickou sterilizací (Lacerda a kol., 2006), nebo triploidizací. Více viz kapitola 2.2.2 Sterilizace.

Aby mohly být PGC identifikovány a izolovány, je nutné je fluorescenčně označit. Injekce těchto fluorescenčních látek probíhá do stádia embrya o maximálně 4 buňkách. Jako fluorescenční barva se nejčastěji používá uměle syntetizovaný zelený fluorescenční protein GFP-*nos1-3'UTR* (Saito a kol., 2006). Pro mnoho kostnatých ryb platí, že PGC dědí specifické maternální cytoplazmatické faktory jako je *vasa* a *nanos 1* mRNA, zmíněné v kapitole 2.1.2. Díky tomu, mohla být syntetizována mRNA obsahující zelený fluorescenční protein (GFP) a *nos1-3'UTR*, což je nepřekládaný region faktoru *nos1* mRNA. Vznikl tak GFP-*nos1-3'UTR* mRNA, který je stabilizovaný v PGC a degraduje v somatických buňkách. Velkou výhodou je možnost použít stejný nasyntetizovaný zelený fluorescenční protein pro vícero druhů ryb, vyhneme se tak nutnosti syntézy proteinu pro každý druh zvlášť (Saito a kol., 2006). Další variantou, jak označit PGC pro následnou vizualizaci a izolaci, je použití FITC-dextran. Jedná se o fluorescenční isothiokyanát, jehož použití popsali Saito a Pšenička v roce 2015, kdy za účelem vizualizace PGC, injikovali FITC dextran do vegetativního pólu embryí jesetera malého (*Acipenser ruthenus*) (Saito a Pšenička 2015).

Fluorescenčně označené PGC jsou pak izolovány manuálně nebo za použití průtokové cytometrie (Goto-Kazeto a kol., 2010; Kobayashi a kol., 2004; Kawakami a kol., 2010). Za nevýhodu transplantace PGC lze považovat množství PGC, které je

možné izolovat, to je jen několik desítek kusů PGC. Výhodou je naopak mnohem jistější úspěšnost transplantace než když transplantujeme blastomery obsahující i somatické buňky. Mechanismus migrace PGC je stejný u mnoha druhů, není proto nutné při transplantaci PGC zohledňovat druhy (Saito a kol., 2014). Příkladem transplantace izolovaných PGC je studie na pstruhu duhovém z roku 2003, kdy se PGC z donora pstruha duhového, značené zeleným fluorescenčním proteinem, izolovaly a následně transplantovaly do recipientů v různých stádiích vývoje (Takeuchi, 2003).

### 2.2.1.3 *Transplantace spermatogonií a oogonií*

Další metodou transplantace zárodečných buněk je možnost transplantovat izolované spermatogonie nebo oogonie. Jedná se o velmi důležitou reprodukční techniku, poprvé aplikovanou v roce 1994 u myši (Brinster a Zimmermann, 1994). Nyní jsou již postupy pro transplantaci spermatogonií/oogonií popsány pro mnoho druhů. Příkladem je transplantace u myši, kuřete (Nagano a Brinster 1998; Li a kol., 2008), nebo u ryb (Nóbrega a kol., 2010; Okutsu a kol., 2008).

Pro úspěšnou transplantaci spermatogonií a oogonií, je nutné nejprve vyjmout gonádu, která je rozstříhána na malé kousky, ty jsou enzymaticky disociovány. Vystavení působení enzymu, nejčastěji kolagenázy, nebo trypsinu, je individuální pro jednotlivé druhy ryb, například pro dánío pruhované je to 1 hodina při teplotě 28,5 °C (Wong a kol., 2011), naproti tomu pro pstruha je čas 7-9 hodin při teplotě 10 °C (Yoshizaki a kol., 2010). V současné době je několik dostupných technik pro izolaci spermatogonií z buněčné suspenze. Patří mezi ně FACS (průtoková cytometrie), při které jsou sortovány buňky podle velikosti s tím, že vysortované velké buňky mající vysoký fluorescenční signál, jsou právě spermatogonie vhodné pro transplantaci (Nóbrega a kol., 2010; Yano, Suzuki, a Yoshizaki 2008; Kise a kol., 2012). Mezi další metody izolace můžeme zařadit gravitační sedimentování pomocí 2-4% BSA gradientu (Hofmann a kol., 2005), Percoll gradient (Pšenička a kol., 2015), nebo magneticky aktivované sortování buněk podle velikosti (MACS) (Příloha 5) (Robles a kol., 2017).

Transplantace spermatogonií/oogonií je pravděpodobně ten nejefektivnější způsob ze všech výše zmíněných metod. Oproti transplantaci PGC je zde přínosem vysoký počet získaných buněk z izolovaných gonád. Navíc tato metoda přináší výhody v podobě hlubšího pochopení regulace spermatogeneze, biologie kmenových buněk, anebo samčí neplodnosti. Samozřejmostí je spojení s uchováním genetických zdrojů, které se díky

těmto metodám stále zefektivňuje. Díky vysoké sexuální plasticitě můžeme pomocí vyzolovaných spermatogonií získat po transplantaci do samice funkční oocyty, jako tomu bylo na příkladu transplantace u pstruha duhového v roce 2010 (Yoshizaki a kol., 2010). Spermatogonie transplantované do samice jsou totiž schopné diferenciaci v oocyty (Okutsu a kol., 2015).

I když je manipulace se spermatogoniemi častější, transplantace oogonií se může stát velmi důležitou, například u organismů mající systém určení pohlaví ZW, kde oogonie poskytují genetickou informaci určení pro obě pohlaví. U transplantace oogonií ovšem existuje jeden problém, a to, že naprostá většina ovárií dospělých ryb je tvořena již vyvinutými oocyty, proto je doporučeno oogonie izolovat pouze z juvenilních jedinců. To pro izolaci spermatogonií neplatí, spermatogonie mohou být izolovány jak z juvenilních, tak z dospělých jedinců (Robles a kol., 2017).

### 2.2.2 Sterilizace recipienta

Pro úspěšnou transplantaci zárodečných buněk je důležité, aby byl recipient sterilní. Sterilizací zamezíme možné kompetici buněk recipienta a donora, která by mohla negativně ovlivnit úspěšnost transplantace, navíc ve většině případů (výjimka u triploidů) zabráníme i produkci vlastních gamet recipienta. Sterilizaci lze provést několika způsoby. První byla vyzkoušena sterilizace metodou chirurgické operace (Brown a Richards, 1979), ovšem tato metoda nezaručuje permanentní sterilitu, jelikož u ryb je prokázána schopnost regenerace gonadální tkáně, navíc je velká šance, že jedinec chirurgickou operací, za účelem vyjmutí testes (nebo ovarii), nepřežije. Dalšími, již běžně používanými metodami, je termo-chemická sterilizace, triploidizace, hybridizace, knockdown genů specifických pro primordiální zárodečné buňky, a nebo vytvoření transgenních jedinců pomocí knockoutu genu (Golpour a kol., 2016; Maclean a kol., 2003). Mezi nové metody můžeme zařadit sterilizaci UV ozařování vegetativního pólu úspěšně aplikovanou u jesetera malého (Saito a kol., 2018).

#### 2.2.2.1 Termo-chemická sterilizace

U určitých druhů ryb je prokázán účinek vyšší teploty na snížení jejich plodnosti, je tomu tak například u gavúnovce argentinského (*Odontesthes bonariensis*) (Strüssmann a kol., 1998) a *Patagonina hatcheri*, u kterých byl proveden experiment o působení zvýšené teploty na plodnost (Ito a kol., 2008). V minulosti bylo využíváno pouze vysoké teploty, které byli jedinci vystavováni přibližně 1-5 týdnů po vykolení, což mělo za následek

degeneraci gonád a apoptózu somatických a zárodečných buněk (Strüssmann a kol., 1998). Při použití vyšší teploty a k tomu chemické látky je úspěšnost sterilizace ještě zvýšena. Chemický vliv zde má látka nazývaná busulfan (1,4 – butanediol dimethanesulfonát). Jedná se o cytostatické léčivo které inhibuje spermatogenezi a je injekčně vpravováno do tělní dutiny recipienta, kterého chceme sterilizovat (Lacerda a kol., 2006).

#### 2.2.2.2 Triploidizace

Je jednou z nejpoužívanějších metod sterilizace. Jedná se o chromozomovou manipulaci, při níž dochází k zadržení druhého pólóvého tělíška, obsahující haploidní sadu chromozomů a tím zmnožení sad chromozomů ze dvou (ze samčího a samičího prvojádra) na tři sady. Triploidizace můžeme dosáhnout za použití tlakových (Opstad a kol., 2013), teplotních (Peruzzi a kol., 2007; Arai a Wilkins 1987), nebo chemických šoků. Šoky musí být většinou provedeny ihned po fertilizaci (Dunham, 2004; Golpour a kol., 2016). Ne vždy je ale zajištěna stoprocentní sterilizace, druh od druhu se úspěšnost sterilizace pomocí triploidizace liší (Dunham, 2004). Například po triploidizaci amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) byla prokázána existence reprodukce schopných triploidních samců (Van Eenennaam a kol., 1990). Indukce triploidie je možná i křížením mezi diploidním a tetraploidním jedincem, kdy vzniká triploidní potomstvo. Toto křížení provedl u piskoře čínského (*Misgurnus mizolepis*) v roce 2004 Nam a Kim. Přežití tetraploidních jedinců, vzniklých díky teplotním šokům, blokujícím první rýhování, provedených v první metafázi, je ale dosti omezené. V tomto případě ze 48 tetraploidních samců byli schopni produkovat funkční  $2n$  spermie pouze tři samci (Nam a Kim, 2004).

#### 2.2.2.3 Hybridizace

Hybridizace je další způsob, jak získat sterilní jedince. Křížením různých druhů mnohdy vznikají potomci, kteří nejsou schopni další reprodukce. Tito sterilní hybridy pak mohou být využiti jako vhodní recipienti, například při transplantaci zárodečných buněk. Kvůli absenci vlastních zárodečných buněk je totiž zajištěno, že nebude docházet ke kompetici s buňkami transplantovanými. Nevýhodou ovšem je, že mnohdy nedojde křížením k úplné sterilitě jedince (Golpour a kol., 2016).

Příkladem využití sterilních hybridů pro transplantaci zárodečných buněk je transplantace ovariálních zárodečných buněk do sterilních hybridů dánia pruhovaného a dánia duhového, provedená v roce 2011 (Wong a kol., 2011). Dalším příkladem je



transplantace blastomer karase stříbřitého „sandwich“ metodou do sterilních hybridů, vzniklých křížením karase stříbřitého s kaprem obecným (Yamaha a kol., 2003).

Co se týče hybridizace, existují i výjimky v podobě přirozeně vznikajících hybridů, kteří nejsou sterilní. K tomuto jevu dochází například u jeseterů (*Acipenseriformes*) (Linhartová a kol., 2018).

#### 2.2.2.4 *Knockdown genů*

Primordiální zárodečné buňky jsou, jak už bylo zmíněno, prekurzory zárodečných buněk (gamet), jejich specifikace a vývoj je závislý na existenci specifických, asymetricky lokalizovaných cytoplasmatických komponentech, zvaných zárodečná plasmata. Právě zde, v zárodečné plasmě, jsou uloženy geny mající vliv na migraci, vývoj a přežití PGC. Knockdown genů je metodou, při níž dochází k potlačení exprese jednoho, nebo více genů. Aby knockdown vedl ke sterilizaci jedince, musí dojít k potlačení genů mající důležitou roli pro vývoj PGC, takovým genem je například již několikrát zmíněný *dnd* gen, nebo transkript *vasa*. Knockdownu dosáhneme aplikací DNA/RNA oligonukleotidů nesoucích komplementární sekvenci k cílovému genu, u kterého chceme potlačit expresi (Summerton 2007; Golpour a kol., 2016; Linhartová a kol., 2015). Největší úspěšnost pro blokaci exprese *dnd* genu prokazuje použití antisense morpholino oligonukleotidu. Morpholino je synteticky vyrobené a využíváno k potlačení funkce genů díky blokaci pre-mRNA splicingu nebo mRNA translaci (Robles a kol., 2017). Nutnou podmínkou je mít vždy morpholino přesně nadesignované pro každý jeden gen (Yamaha a kol., 2007). Další možností jak dosáhnout knockdownu genu, kromě použití morpholina, je použití buď fosforothioat-vázané DNA (S-DNA), nebo krátkých interferujících RNA (siRNA) (Summerton, 2007).

#### 2.2.3 Chiméry zárodečné linie

Pokud je transplantace spermatogonií/oogonií, PGC nebo blastomer úspěšná, dochází ke vzniku tzv. chiméry zárodečné linie. Tak je nazýván jedinec, který v sobě nese genetickou informaci jiného jedince, v tomto případě v podobě zárodečných buněk transplantovaných do jeho těla (Wong a kol., 2011). Transplantované buňky se pak v těle vyvíjí a jakmile dosáhne tento jedinec pohlavní dospělosti, získáváme od něj potomstvo donora. Prvními příklady úspěšného vytvoření chiméry zárodečné linie u kostnatých ryb jsou transplantace blastomer do recipientů dána pruhovaného v roce 1992 (Lin a kol., 1992) a transplantace blastomer, ale u medaky japonské o rok později (Wakamatsu,

1993). Existuje i mnoho dalších experimentů, při kterých byly úspěšně vytvořeny chiméry zárodečné linie. Příkladem může být transplantace embryonálních buněk z kultury do embryí dáňia pruhovaného (Ma a kol., 2001) nebo do embryí medaky japonské (Hong a kol., 1998). Dále ještě v roce 2001 transplantace blastomer u pstruha duhového (Takeuchi, Yoshizaki a Takeuchi, 2001). Následovaly experimenty v roce 2011, kdy Wong a kol. vytvořili chiméry u dáňia pruhovaného transplantací ovariálních zárodečných buněk do sterilních larev (Wong a kol., 2011), nebo také u dáňia pruhovaného, ale metodou transplantace izolovaných PGC, což provedl Kawakami a kol. (2010).

#### 2.2.4 Reprodukce metodou náhradních rodičů

Hlavním důvodem pro využití metody náhradních rodičů je skutečnost, že ve světě přibývá kriticky ohrožených druhů ryb, které je zapotřebí chránit a znovu obnovovat. Navíc jsme schopni touto metodou ovlivňovat různá reprodukční specifika, jako je například doba, za kterou získáme gamety. Pokud totiž budeme transplantovat zárodečné buňky, ať už v podobě PGC, nebo spermatogonií/oogonií do recipienta příbuzného druhu, který má kratší dobu pohlavního dospívání, můžeme získat potomstvo rychleji, než kdybychom se snažili rozmnožit cílový druh přirozeně (Yoshizaki a kol., 2003). Jako příklad můžeme uvést úspěšnou transplantaci zárodečných buněk pstruha duhového do náhradního rodiče v podobě lososa masu. Tímto způsobem byla zkrácena doba, za kterou lze získat funkční gamety pstruha duhového. Samci lososa masu jsou totiž plodní již v jednom roce, oproti tomu samci pstruha duhového jsou plodní až ve dvou letech (Kobayashi a kol., 2004). Dalším příkladem pak může být transplantace mezi dvěma druhy jeseterů, konkrétně transplantace zárodečných buněk mezi jeseterem sibiřským (*Acipenser baerii*) jako donorem buněk a jeseterem malým jako recipientem. Výsledkem této transplantace bylo vytvoření chiméry zárodečné linie, díky které je teoreticky možné zkrácení reprodukčního cyklu jesetera sibiřského z 18-25 let na pouhých 5 let. Zároveň snížíme i nutnou velikost prostoru pro odchov. Jeseter malý, zde použitý jako recipient, totiž dorůstá mnohem menších velikostí (Pšenička a kol., 2015).

### 2.3 Kryoprezervace

Kryoprezervace je velmi vhodným nástrojem pro uchovávání genetického materiálu. Zachování genetických zdrojů se v současné době stává velmi důležité. Mnoho druhů ryb je ohroženo faktory vznikajícími lidskou činností, jako nadměrným rybolovem, nebo

znečištěním a degradací přirozených habitatů (Flajšhans, 2013; Okutsu a kol., 2006b). Kryoprezervace nalézá široké uplatnění i v oblasti akvakultury (Tiersch a kol., 2007), kdy se zamrazují nejčastěji spermie různých linií a plemen druhů ryb. Tyto spermie se posléze rozmrazí a použijí k oplodnění jiker. Po dlouhou dobu byly spermie jediné buňky, které se daly za účelem reprodukce zmrazit. Existuje proto mnoho odborných publikací popisujících postup zmrazení spermií u různých druhů ryb (Babiak a kol., 1997; Linhart a kol., 2000; Cabrita a kol., 2001; Berghmans a kol., 2004; Magnotti a kol., 2016; Kutluyer a Kocabas, 2016). Nejsou to ale jen spermie, které se zamrazují v tekutém dusíku. Už i u ryb existují experimenty na zamrazování oocytů v ranějším stádiu vývoje (Guan a kol., 2010), celých testes (Lee a kol., 2013), ale nově i embryí (Khosla a kol., 2017; Magyary a kol., 1995). Je prokázáno, že buňky dokáží přežít zmrazení v tekutém dusíku po velmi dlouhou dobu, ovšem vždy může nastat riziko spojené jak se zamrazováním, tak s následným rozmrazováním, kdy dochází k navrácení buněk do původního fyziologického stavu (Mazur, 1984).

Metody na zamrazování oocytů a embryí se stále vyvíjí. Například oocyty ryb nejdou úspěšně zamrazovat kvůli své velikosti, kdy například jikra dánia pruhovaného dosahuje průměru 1 mm, což je mnohonásobně více než u oocytů savců, u kterých je běžný průměr oocytu přibližně 100  $\mu\text{m}$ , zároveň propustnost membrány oocytu pro vodu a kryoprotektanty je nízká, díky čemuž nejde během zamrazování minimalizovat riziko vzniku ledových krystalů (Reichel a kol., 2014). Dalším problémem je pak velký obsah žloutku, který také brání úspěšnému zamrazení (Streit a kol., 2014). Pro lepší výsledky při zmrazování oocytů je používána metoda rychlého zamrazení a následného ohřívání a rozmrazení, neboli vitrifikace. Tuto metodu první popsali Rall a Fahy (1985). Tato metoda vyřešila problém týkající se vzniku ledových krystalů v intracelulárním prostoru zamrazovaných buněk. Na druhou stranu, při vitrifikaci je nutné použití kryoprotektantů o vyšší koncentraci, což může způsobit toxické poškození (Guan a kol., 2010).

U kryoprezervace embryí došlo v posledních letech k mnoha pokrokům. V roce 2017 se týmu Khosla a kol. podařilo úspěšně zamrazit a následně i rozmrazit celé embryo dánia pruhovaného, které bylo po zamrazení životaschopné. Pro rozmrazení, které embryo neporušilo, byly použity nanočástice zlata, které se díky absorpci laserového záření zahřály a způsobily tak rychlé a úspěšné rozmrazení embrya (Khosla a kol., 2017).

### 2.3.1 Kryoprotektanty

Kryoprotektanty jsou chemické látky, jejichž úkolem je chránit buňky proti možnému poškození při zamrazování a rozmrazování. Kryoprotektant pronikne do buněk přes buněčnou membránu a následně reguluje osmotické prostředí během zmrazování, zároveň zabraňuje vytváření ledových krystalů a pomáhá snižovat změny v objemu buňky a pH (Berghmans a kol., 2004). V současné době lze pro kryoprezervaci zárodečných buněk a gamet použít několik různých kryoprotektantů dělených do dvou typů. Kryoprotektanty které pronikají membránou buňky, jako je například methanol (MeOH), ethylen glycol (EG), propylen glycol (PG), dimethyl sulfoxid (Me<sub>2</sub>SO), nebo glycerol (Gly) o různé molární koncentraci. Tyto zmíněné kryoprotektanty zvyšují viskozitu uvnitř buňky a zabraňují tak formování ledových krystalů z vody uvnitř buňky. Druhým typem jsou pak kryoprotektanty, které přes buněčnou membránu nepronikají a celou dobu zůstávají vně buňky. Tyto kryoprotektanty dělíme dále na osmoticky aktivní, mezi něž patří například sukrosa a trehalóza, nebo osmoticky inaktivní, jako je maltodextrin a albumin. Tento typ kryoprotektantů funguje tak, že obklopením buňky způsobují její dehydrataci, zatímco zároveň zvyšují osmoalitu kryomédia (Lee a Yoshizaki 2016; Palmer a kol., 1993; Sieme a kol., 2016). Vždy je nutné použít specifickou koncentraci kryoprotektantu, použití větší koncentrace totiž může mít toxické účinky (Best, 2015; Muchlisin, 2005).

### 2.3.2 Kryoprezervace spermatogonií a oogonií

Při kryoprezervaci spermatogonií/oogonií dochází k zamrazení a následnému uchování izolovaných testikulárních/ovariálních kmenových buněk v tekutém dusíku, nebo rovnou zamrazování celé testikulární/ovariální tkáně. Postup kryoprezervace spermatogonií je vcelku snadný, nejdříve musí dojít k izolaci zárodečných kmenových buněk z tkáně (testes, ovaria) zvoleného donora. Izolaci zárodečných buněk, která probíhá za použití různých technik, předchází nutná enzymatická disociace odebrané tkáně. Mimo kryoprezervaci spermií (Berghmans a kol., 2004), samostatných PGC (Kobayashi a kol., 2007), nebo i celých testes (Lee a kol., 2013), je kryoprezervace spermatogonií a oogonií dalším vhodným způsobem zachování genetických zdrojů ryb. Důvodem je například množství buněk, které jsme schopni z testes, nebo ovarií vyizolovat. Kryoprezervací spermatogonií/oogonií zároveň, díky jejich plasticitě, zachováváme paternální i maternální genetickou informaci, kterou můžeme snadno díky transplantaci přenést do recipienta a následně získat potomstvo se znaky donora. Nejvýhodnější je izolovat

spermatogonie, stejně jako oogonie, od juvenilních jedinců, kde máme jistotu, že ještě nejsou zcela vyvinuté gamety. Získáváme tak izolaci velké množství zárodečných buněk (Shang, 2013).

Kryoprezervaci spermatogonií provedl například v roce 2016 Marinović a kol., kteří zamrazovali jak testikulární tkáň, tak spermatogonie dvou druhů ryb – lína obecného (*Tinca tinca*) a karase zlatého (Marinović a kol., 2016). Dále Lee a Yoshizaki (2016) s kryoprezervací spermatogonií u kriticky ohroženého lenoka sibiřského. V neposlední řadě i kryoprezervace izolovaných spermatogonií a oogonií u ohroženého jesetera sibiřského (Pšenička a kol., 2016), nebo u lína obecného (Linhartová a kol., 2014).

### 2.3.3 Perspektivy využití kryoprezervace

V současné době, dochází u mnoha druhů k rapidním poklesům populací, kdy mnohdy hrozí až jejich úplné vyhynutí. Proto se nynější akvakultura obrací k různým možnostem zachování genetických zdrojů jak ohrožených druhů ryb (Pšenička a kol., 2016; Lee a Yoshizaki 2016), tak druhů komerčně důležitých, například pstruha duhového (Okutsu a kol., 2006a). Jednou z takových možností a zároveň velmi vhodnou, je kryoprezervace. Kryoprezervace nabízí mnoho výhod. Jedná se o metodu zachování genetického zdroje *ex situ*, snižují se tím pádem nároky na prostor. Potřeba jsou pouze prostory pro zamrazené zárodečné buňky, spermie atd., navíc touto metodou uchováváme existující alelickou diverzitu druhů na pozdější využití. Vzorky totiž můžeme mít uchovány v tekutém dusíku po dlouhou dobu (Hiemstra, Lende a Woelders, 2005).

Již nyní je jisté, že metoda kryoprezervace, tedy uchování v tekutém dusíku po delší dobu, má mnoho pozitiv. Můžeme tak v genetických bankách zachovávat nepřeborné množství důležitých druhů, například právě v podobě zamrazených izolovaných spermatogonií, které můžeme po snadném rozmrazení transplantovat do zvoleného recipienta a získat tak potomstvo s požadovanými znaky donora. Pokud zvolíme recipienta (náhradního rodiče) vhodně, může dojít například i ke zkrácení reprodukčního cyklu, nároků na prostor, nebo i zvýšení počtu získaných gamet/potomků, například pokud zvolíme recipienta s vyšší plodností, než má donor (Lacerda a kol., 2013).

### 3 Materiál a metodika

#### 3.1 Získání testikulární tkáně

Samci kapra obecného ve věku 1 roku, váhy těla  $128 \pm 41$  g (Příloha 1) byli chováni v recirkulačním systému při stálé teplotě 22 °C. Krmeni krmivem s nízkým obsahem tuku probíhalo jednou za den. Ryby byly předávkovány použitím 2-fenoxyethanolu, následně byla oddělena hlava a celé tělo ryby bylo z důvodu zbavení se bakterií omyto 70% ethanolem. Po otevření dutiny tělní byly vyjmuty testes, které se následně promyly v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). Z testes byly odstraněny veškeré větší krevní kapiláry. Samotné testes byly rozstříhány na kousky, které byly váženy na analytických váhách na hmotnost přibližně 100 mg. Před vážením byly kousky tkáně osušeny na papírovém ubrousku (Kimtech). Přebytečná voda by totiž mohla přidávat na výsledné hmotnosti.

Jedna část vzorků, použitá jako kontrola, byla vložena do 2 ml zkumavek a ihned co nejvíce rozstříhána pomocí pružinových nůžek, poté disociována za pokojové teploty na laboratorní třepače v L-15 médiu s přidáním 0,15% trypsinu, 0,05% DNasy a 0,05% kolagenázy. Během disociace se suspenze každých 20 minut opatrně promíchala pipetou. Disociace byla ukončena po 2 hodinách přidáním 100  $\mu$ l 100% FBS (fetal bovine serum) a 400  $\mu$ l L-15 média. Vzorky byly filtrovány přes CellTrisc® 30  $\mu$ m filtry (Sysmex) do nové 2 ml zkumavky. Suspenze byla stočena na centrifuze po dobu 10 minut, při rychlosti 400 g. Tekutina nad peletou (supernatant) byla oddělena a peleta se jemným pipetováním resuspendovala v 20  $\mu$ l L-15 média. Suspenze buněk byla podle protokolu (Warren, 2001) smíchána s 0,5% trypanovou modří, rozpuštěnou v PBS v poměru 1:1 a přibližně 10  $\mu$ l bylo napipetováno do Bürkerovi počítací komůrky (Příloha 3). Počet spermatogonií byl počítán pod mikroskopem s fázovým kontrastem při zvětšení 40x, podle vzorce  $b = \frac{n}{c*v*h} * z$ , kde  $b$  je počet buněk v 1  $\text{mm}^3$ ,  $n$  celkový počet spermatogonií,  $c$  počet čtverců (25),  $v$  plocha čtverce,  $h$  hloubka komůrky,  $z$  použité ředění suspenze (Příloha 4). Viabilita buněk v ošetřených skupinách byla počítána jako procento živých buněk odečtené od celkového počtu buněk (živé + mrtvé) ve skupině kontrolní.

## 3.2. Kryoprezervace

### 3.2.1 Kryoprotektanty

Pro kryoprezervaci spermatogonií kapra bylo srovnáno 6 druhů kryoprotektantů, dimethylsulfoxid ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), ethylen glycol (EG), glycerol (Gly),  $\text{Me}_2\text{SO}$ +Propylen glycol, menthanol (MeOH) a 2-methoxyethanol (ME). Každé kryomedium bylo složeno z 1,5M kryoprotektantu, 1,5% BSA (Bovine serum albumin), 25mM Hepes rozpuštěného v PBS a 0,1M glukózy. Zvážené vzorky tkáně o hmotnosti cca 100 g byly vloženy do 2 ml kryozkumavek spolu s 1 ml kryomédia a následně stabilizovány (ekvilibrovány) po dobu 15 minut na ledu, poté se zkumavky vložily do CoolCell boxu (Biocision) a uložily do  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Vzorky byly vyndány po 4 hodinách, zkumavky byly vloženy do tekutého dusíku a zde ponechány minimálně 7 dní. Vzorky byly rozmrazeny ponořením do vodní lázně o teplotě  $26\text{ }^\circ\text{C}$ . Poté byla rozmrazená tkáň promyta v PBS a následně rehydratována v L-15 médiu. Pro zjištění životaschopnosti rozmrazených buněk se opakoval postup stejný jako u kontrolní skupiny, viz výše. Kryoprotektant dimethylsulfoxid, který v předchozím testování vyšel nejlépe, byl použit v následných experimentech týkajících se vlivu koncentrace a rychlosti zamrazování, hmotnosti tkáně a druhu přidaného cukru na životaschopnost spermatogonií.

### 3.2.2 Koncentrace kryoprotektantu a rychlost zamrazování

Dalším krokem bylo stanovit vhodnou koncentraci kryoprotektantu dimethylsulfoxidu spolu s rychlostí zamrazování. Testovalo se několik koncentrací (1; 1,5; 2; 2,5; 3M) a rychlostí zamrazování ( $-0,5$ ;  $-1$ ;  $-2,5$ ;  $-5$ ;  $-10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ). Vzorky byly zmrazovány do  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  v programovatelném mrazáku Controlled Rate Freezer 14S (SY-LAB) ve zmíněných rychlostech. Po zamrazení byly vzorky uloženy do tekutého dusíku. Pro experiment bylo použito médium skládající se z  $\text{Me}_2\text{SO}$  o 2M koncentraci, 1,5% BSA, 25mM Hepes rozpuštěného v PBS a 0,1M glukózy.

### 3.2.3 Velikost tkáně a doba ekvibrace

Kousky tkáně o hmotnosti 50, 100, 150 mg, vážené na analytických váhách, byly ekvilibrovány na ledu po dobu 15, nebo 30 minut, poté vloženy do kryomédia z předchozího experimentu a zmrazeny v CoolCell boxu (Biocision).

### 3.2.4 Cukry

Ke kryomédiu obsahujícímu 2M  $\text{Me}_2\text{SO}$ , 1,5% BSA, 25mM Hepes bylo přidáváno několik druhů cukrů s cílem zjistit, jaký z nich je nejvhodnější, co se životaschopnosti

spermatogonií týče. Přidávanými cukry byly, glukóza, fruktóza, trehalóza a sukrosa v koncentraci 0,1M a 0,3M.

### 3.3. Transplantace

#### 3.3.1 Příprava recipientů

Jedinci karase zlatého, získaní od místního chovatele, byli injikováni intraperitoneálně kapří hypofýzou. U samců proběhla injekce jedenkrát a to v množství 1,5 mg kapří hypofýzy/kg. U samic proběhly dvě dávky hypofýzy, ve 24 a 12 hodinách před plánovaným odebráním jiker. Nejprve se injikovala přípravná dávka 0,5 mg kapří hypofýzy/kg a po 12 hodinách se injikovalo 2,5 mg kapří hypofýzy/kg. Jikry byly získány masáží břišní dutiny a po odebrání uloženy v chladu. Jikry od tří jikernaček byly smíchány a oplozeny spermatem smíchaným od 5 samců. Embrya nebyla dechorionována, nechala se přilepená na petriho misce a uložila se do inkubátoru při teplotě 23 °C. Injekce embryí 50mM roztokem *antisense dead end* morpholino o komplementární sekvenci CATCACAGGTGGACAGCGGCATGGA (GeneTools), probíhala ve stádiu dvou buněk pod blastodisk (Goto a kol., 2012). Injekce byla prováděna za použití mikromanipulátoru M-152 (Narishige) a mikroinjektoru CellTram Vario (Eppendorf) pod běžným stereomikroskopem (Příloha 6). Voda byla měněna pravidelně každý den až do vykulení. Vykulená a již rozplavaná embrya byla krmena naupliemi žábřonožky solné *ad libitum*.

#### 3.3.2 Transplantace

Transplantace izolovaných spermatogonií kapra obecného byla u embryí karase zlatého provedena 11 dní po oplození. Suspenze buněk pro transplantaci byla připravena ze zmrazené a nezmrazené testikulární tkáně (Příloha 2). Obě suspenze buněk byly purifikovány za použití 30% Percoll gradientu (Pšenička a kol., 2015). Larvy byly anestetovány 0,05% roztokem MS222. Následně byly larvy injikovány buněčnou suspenzí do peritoneální dutiny pomocí skleněné kapiláry, mikromanipulátoru M-152 (Narishige), mikroinjektoru FemtoJet® (Eppendorf) a stereomikroskopu (Příloha 7). Odhadovaný počet transplantovaných buněk byl 5000 kusů buněk na jednu larvu. Po transplantaci byly larvy přemístěny do čisté vody a zde ponechány pro zotavení. Následně krmeny po přibližně 2 týdny naupliemi žábřonožky solné. Chiméry zárodečné linie pak byly přemístěny do akvárií a začaly se krmit granulovaným krmivem (Scarlet, Coppens).



Jako prevence proti možnému zvratu pohlaví zapříčiněného teplotou, byla teplota vody v nádržích držena na 25 °C po dobu 1 měsíce od oplození (Goto a kol., 2006).

### 3.3.3 Identifikace chimér zárodečné linie

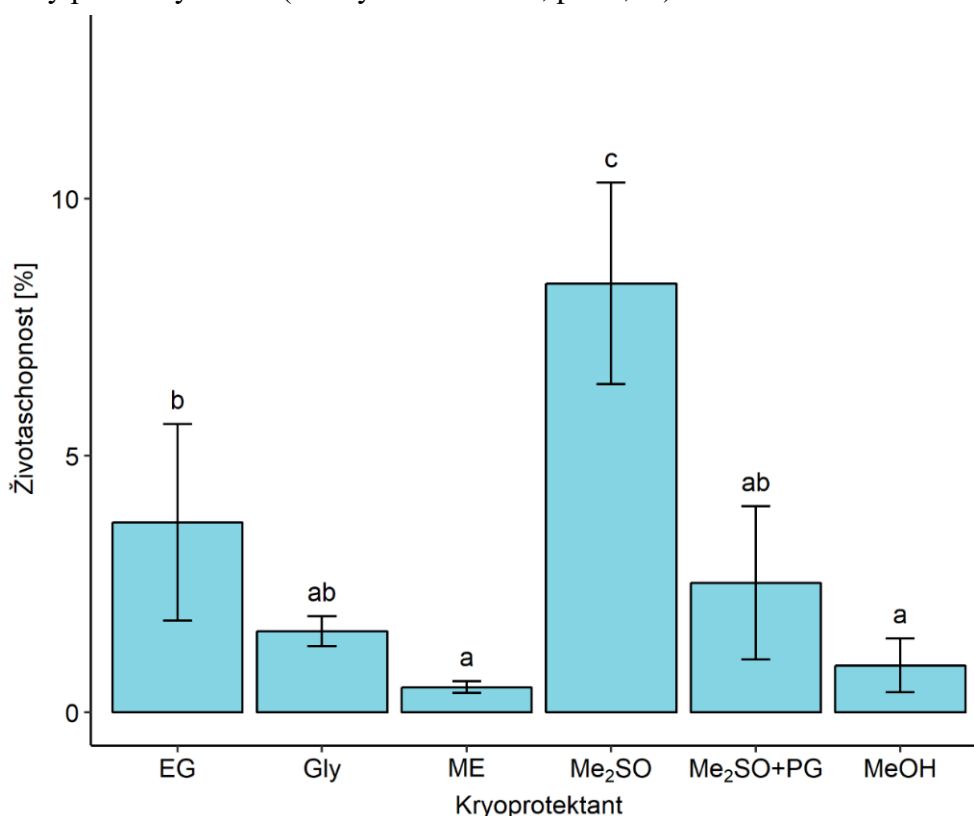
40 jedinců (stáří 2 měsíce, tělesné váhy  $5,6 \pm 2,3$  g) z každé skupiny, bylo nejprve usmrceno použitím koncentrovaného roztoku Tricainu a poté vypitváno. Gonáda byla opatrně vyjmuta, rozstříhána na 3 části a uchována odděleně ve stabilizačním roztoku RNA later pro pozdější RNA izolaci. RNA byla izolována použitím TRIzol činidla (Invitrogene) podle protokolu výrobce. Vyizolovaná RNA byla přepsána na cDNA pomocí Transkriptor High Fidelity cDNA Synthesis kitu (Roche). Specifické primery daného druhu pro RT PCR byly nadesignované na *vasa* gen (specificky exprimovaný v zárodečných buňkách) z publikovaných genomových sekvencí pomocí prime3plus. Primer pro karase zlatého forward 5'- CGGCTAGCCTGAGAGATGAG, reverse primer 5'- GATCTCGATAACCCCGTTCA. Pro kapra - forward primer CGGCCGGCCGGAGAGATGAG a reverse primer GATCTGGATAACCCCATACA. Zředění primerů bylo provedeno podle instrukcí výrobce. Reakční roztok pro PCR obsahoval 1  $\mu$ l templátu cDNA, 0.5  $\mu$ l forward and 0.5  $\mu$ l reverse primer, 5  $\mu$ l PPP Master Mix (Top-Bio) a 3  $\mu$ l PCR H<sub>2</sub>O. Reakční podmínky se sestávaly z 35 cyklů při 94 °C a 30 s, 58 °C při 30 s a 72 °C při 30 s. Produkty byly analyzovány na 2% agarosovém gelu pro elektroforézu na UV iluminátoru.

## 3.4 Statistické vyhodnocení dat

Pro snažší vyjádření výsledků bylo přežití buněk (zkoumané vždy v triplicátech) převedeno na procenta. Na data byla aplikována arcsinová transformace z důvodů zajištění normality dat. Normalita a homoskedasticita dat byla prověřena Shapiro-Wilkovo testem a Leveneovým testem při hladině významnosti  $p < 0.05$ . Data byla testována analýzou variance (dle typu vstupních dat byla užitá jednocestná, či dvoucestná anova) ke zjištění signifikance jednotlivých faktorů v navrženém modelu s hladinou významnosti  $p < 0.05$ . Následoval Tukeyho test k porovnání jednotlivých úrovní každého faktoru či jejich interakcí v případě dvoucestné anovy. Analýza byla provedena v programu R verze 3.4.2.

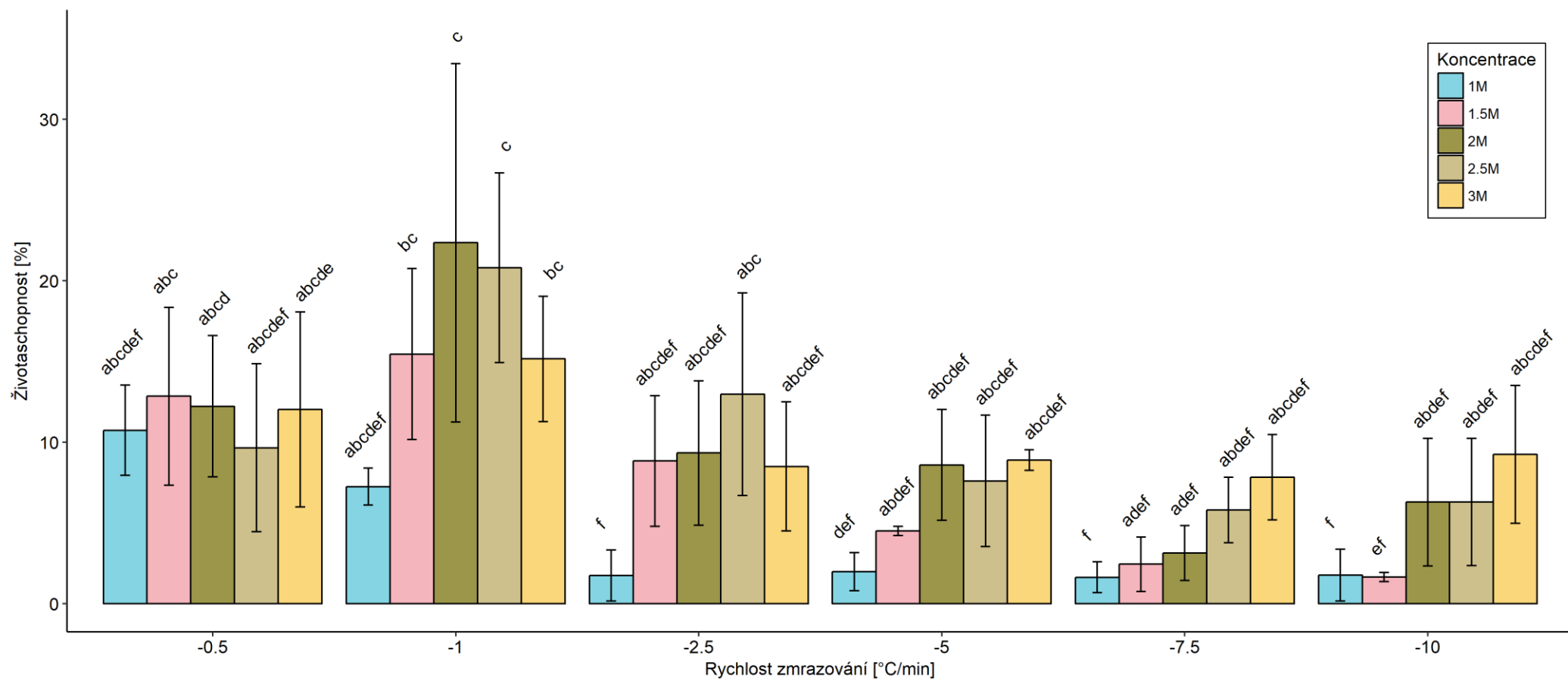
## 4 Výsledky

Přežití buněk v různých kryoprotektantech bylo relativně nízké (0,3 – 8,3 % ve srovnání s kontrolní skupinou), nejvyšší přežití (průměr třech opakování 8,3 %), ve srovnání s kontrolní skupinou, vykazovalo použití kryoprotektantu dimethylsulfoxidu Me<sub>2</sub>SO (graf 1). V porovnání s ostatními kryoprotektanty byl zjištěn pouze u Me<sub>2</sub>SO statisticky průkazný rozdíl (Tukey-ho HSD test,  $p < 0,05$ ).



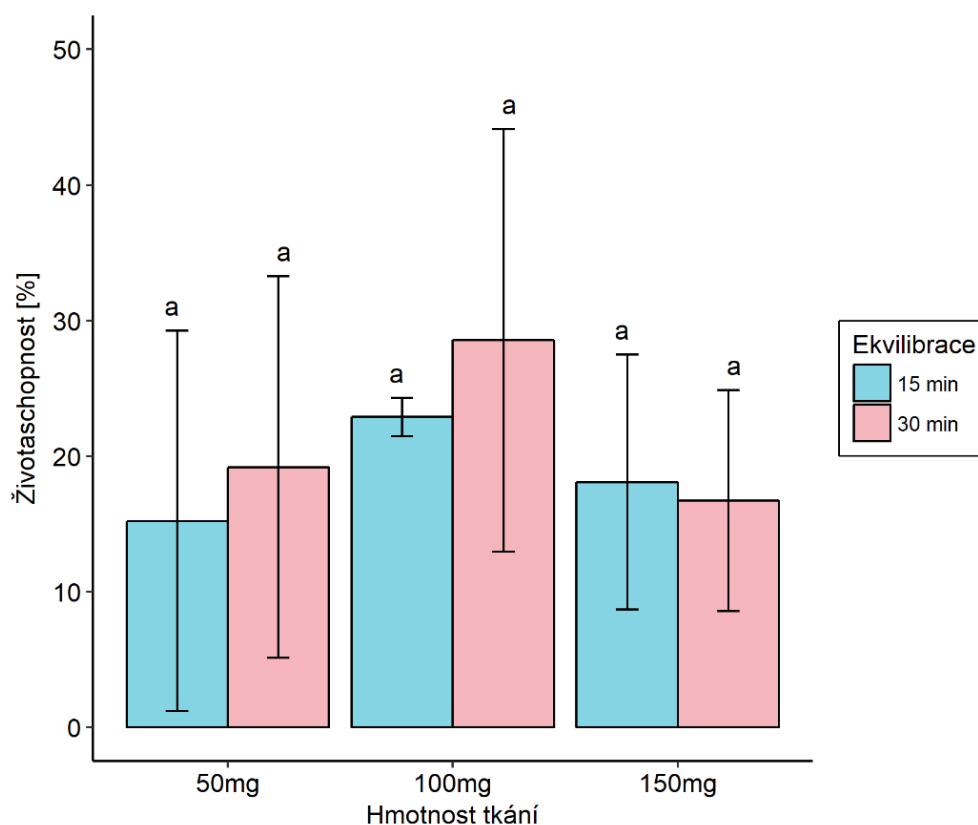
Graf 1: Srovnání různých používaných kryoprotektantů a jejich vliv na životaschopnost spermatogonií (%) vůči kontrolní skupině; odlišná písmena značí statistický rozdíl mezi skupinami

Následovalo testování kryoprotektantu dimethylsulfoxidu (Me<sub>2</sub>SO) o různých koncentracích (1M, 1,5M, 2M, 2,5M a 3M) spolu s rozdílnými rychlostmi zamrazování (- 0,5 až - 10 °C/min). Kombinace těchto koncentrací a rychlostí zamrazování ukázaly rozdíly vlivu na životaschopnost spermatogonií mezi několika skupinami (Tukey-ho HSD test,  $p < 0,05$ ). Životaschopnost vyšší jak 20 % prokázala pouze kombinace 2 a 2,5M koncentrace spolu s rychlostí zamrazování - 1 °C/min. Použití pomalejší rychlosti zamrazování vždy vykazovalo vyšší přežití spermatogonií, ve srovnání s rychlejším zamrazováním. Odolnost spermatogonií vůči rychlejšímu zamrazování se zvyšovala spolu s koncentrací Me<sub>2</sub>SO (graf 2).



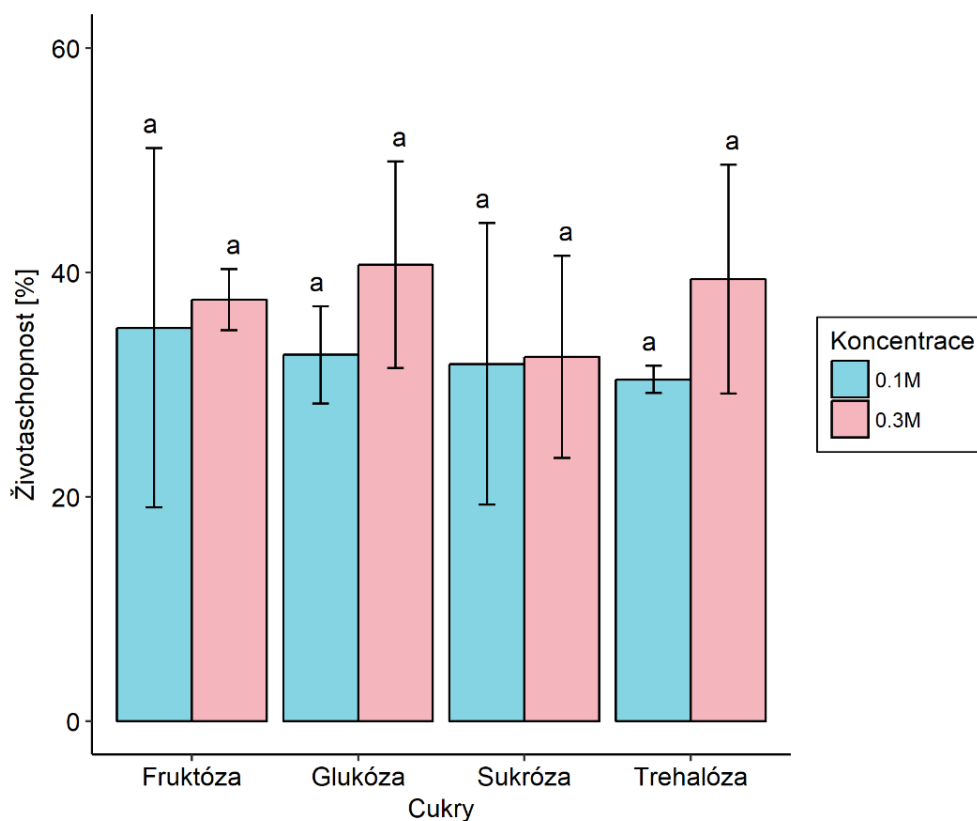
Graf 2: Porovnání vlivu různých koncentrací a rychlostí zamrazování kryoprotektantu Me<sub>2</sub>SO na životaschopnost spermatogonií; odlišná písmena znázorňují statistickou odlišnost mezi jednotlivými skupinami

Další částí experimentu bylo porovnávání vlivu hmotnosti zamrazované testikulární tkáně izolované z jedinců kapra obecného, spolu s různou dobou ekvilibrace, na přežití spermatogonií. V testování odlišných kombinací vyšlo nejlépe použití 100mg tkáně spolu s dobou ekvilibrace 30 min, při kterém bylo přežití spermatogonií 28,5 %. U dat ovšem, stejně jako v předchozím experimentu, nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl (dvoucestná A-nova,  $p > 0,05$ ) (graf 3).



Graf 3: Testování vlivu hmotnosti (mg) tkáně pro zamrazení spolu s dobou ekvilibrace (15/30 min) na životaschopnost spermatogonií

Poslední částí experimentu bylo porovnání vlivu přidávaných cukrů o různé koncentraci do kryomédia obsahující 2,5M Me<sub>2</sub>SO. Byly srovnány čtyři druhy cukrů. Nejvyšší přežití spermatogonií (40,7 %) vykazovalo přidání 0,3M glukózy, ovšem výsledek není statisticky rozdílný vůči ostatním cukrům a jejich koncentracím (dvoucestná Anova,  $p > 0,05$ ) (graf 4).



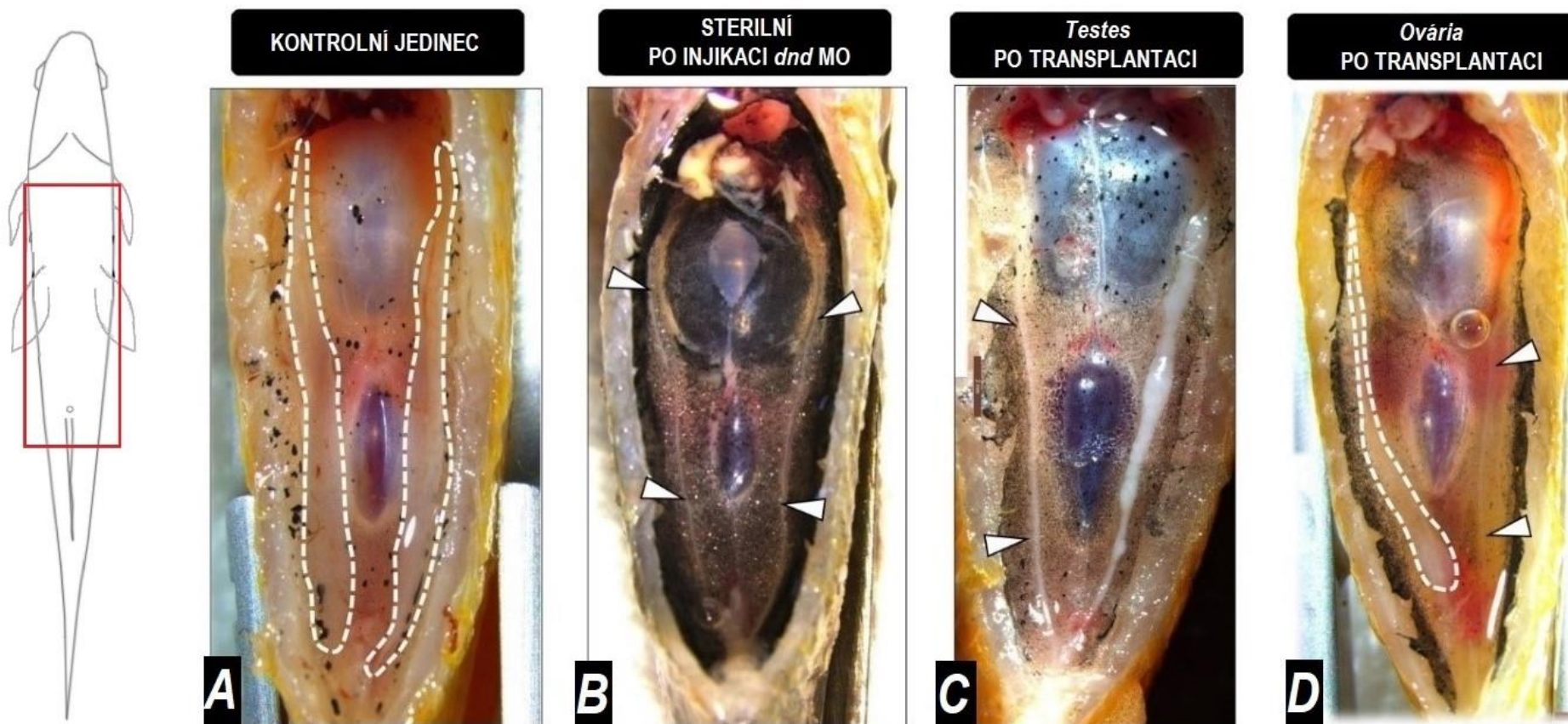
Graf 4: Porovnání vlivu přidávaných cukrů o různé koncentraci na životaschopnost spermatogonií vůči skupině kontrolní

Po experimentu, týkajícího se kryoprezervace spermatogonií kapra obecného, byly kryoprezervované spermatogonie rozmrazeny a následně transplantovány do sterilních larev karase zlatého. Recipienti byli sterilizováni injekcí *dnd* MO. Po disekci nevykazovali sterilní jedinci vyvinuté gónády (obr. 6). Všechny vzorky z gonád sterilních jedinců byly negativní na přítomnost *vasa* primerů karase. Potvrzení úspěšnosti transplantace spermatogonií kapra do náhradních rodičů bylo stanoveno na základě disekce gonád. Pokud byly v recipientech vyvinuty gonády, byla ze vzorku těchto gonád provedena RT-PCR s druhově specifickým primerem pro *vasa* gen kapra. U ryb, u kterých byla provedena transplantace kryoprezervovaných spermatogonií, mělo viditelně vyvinuté gonády 17 ze 40 jedinců. Kapří *vasa* RNA byla detekována u všech pozitivních

vzorků. U jedinců, kteří podstoupili transplantaci čerstvě izolovaných spermatogonií (bez kryoprezervace), mělo viditelně vyvinuté gonády 21 ze 40 ryb (tab. 2). U všech byla taktéž detekována kapří RNA. Z výsledků kryoprezervace a transplantace tedy lze vyčíst, že u kapra obecného je možné úspěšně zamrazovat a následně transplantovat rozmrazené spermatogonie.

*Tabulka 2: Úspěšnost transplantace spermatogonií (kryoprezervované/čerstvé) vůči kontrolní skupině*

Skupina	Vyvinuté gonády	Testes / ovária	Positivní na kapří vasa RT-PCR	Positivní na karasí vasa RT-PCR
Kontrola	40/40	17/26	0	40
Transplantace kryoprezervovaných spermatogonií	17/40	10/7	17	0
Transplantace čerstvě izolovaných spermatogonií	21/40	14/7	13	0



Obrázek 6: Ventrální pohled na břišní dutinu (A-D); (A) Kontrola s vyjmutými ovárii – označeny bílou přerušovanou čárou); (B) nevyvinuté gonády jedince po sterilizaci metodou injekce dnd MO; označeny šipkami (C) testes jedince po úspěšné transplantaci spermatogonií; označeny šipkami (D) jedno vyvinuté ovárium jedince po transplantaci kryoprezervovaných spermatogonií – označeno bílou přerušovanou čárou

## 5 Diskuse

U ryb je kryoprezervace a transplantace zárodečných buněk vhodnou metodou pro zachování ať už ohrožených, nebo komerčně důležitých druhů (Flajšhans, 2013). V této diplomové práci byla úspěšně realizována metoda kryoprezervace a následné transplantace zárodečných buněk, konkrétně spermatogonií, u kapra obecného do zvoleného recipienta karase zlatého. Cílem prvního experimentu bylo zjistit nejvhodnější kryoprotektant, který bude následně použit do kryomédia pro zamrazování testikulární tkáně obsahující spermatogonie. Bylo testováno celkem šest rozdílných kryoprotektantů, které jsou běžně používány v obdobných studiích týkajících se kryoprezervace zárodečných buněk (Higaki a kol., 2010a; Higaki a kol., 2010b; Lee a kol., 2013; Marinović a kol., 2016). Dimethylsulfoxid vyšel v experimentu jako jediný statisticky odlišný a můžeme ho tedy považovat za nejvhodnější pro použití do kryomédia pro zamrazování spermatogonií kapra obecného. Tento výsledek koreluje s výsledky kryoprezervace u lína obecného (Linhartová a kol., 2014), lenoka sibiřského (Lee and Yoshizaki, 2016), nebo pstruha duhového (Lee a kol., 2013). To ovšem neznamená, že ostatní kryoprotektanty nemůžou být vhodnější u jiných druhů ryb, například pro kryoprezervaci zárodečných buněk jesetera sibiřského je nejvhodnějším kryoprotektivem ethylen glykol (Pšenička a kol., 2016), u lína obecného pak glycerol (Linhartová a kol., 2014). Míra přežití spermatogonií při používání nejvhodněji zvoleného kryoprotektantu se také liší druh od druhu. Stejných výsledků, jako v případě této práce, dosáhl i Lee a kol. u pstruha duhového (Lee a kol., 2013), na druhou stranu pozitivnějších výsledků, v podobě 70% životaschopnosti buněk, bylo dosaženo ve studii s jeseterem sibiřským (Pšenička a kol., 2016). Citlivost na kryoprotektanty se tak očividně liší mezi jednotlivými druhy, je proto nutné vytvářet protokoly pro zamrazování vždy pro konkrétní druh.

Studie od Marinović a kol. (2016) a Pšeničky a kol. (2016) srovnávaly možný vliv zamrazování izolovaných buněk na jejich přežití. O něco lepší se jeví postup, kdy je zamrazována celá tkáň, než samostatné izolované buňky. Stejně výsledky se dají očekávat i pro ostatní druhy ryb. Kryoprezervace celé tkáně gonád je výhodnější proto, že u této tkáně můžeme provést disociaci, následně ji inkubovat v kryoprotektantu, zamrazit v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a poté po 2-3 hodinách pomalého zamrazování ( $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) uchovávat v tekutém



dusíku. Postup kryoprezervace izolovaných buněk obvykle trvá minimálně o 3 hodiny déle, z důvodu nutného použití enzymu, filtrace a centrifugace.

Dalším důležitým faktorem bylo stanovit vhodnou koncentraci  $\text{Me}_2\text{SO}$ . Testováno bylo celkem pět různých koncentrací tohoto kryoprotektantu. Menší a vyšší koncentrace vykazovaly trend nižšího přežití. Stejný trend popsal i Lee a kol., u pstruha duhového, kde snížení koncentrace na 0,3M způsobilo až 3x sníženou životaschopnost buněk (Lee a kol., 2013). Nejlepší výsledky pak vykazovalo použití kryoprotektantu o koncentraci 2M spolu s rychlostí zamrazování  $-1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . Stejný případ, kdy vyšší koncentrace vykazuje vyšší přežití, popsal Marinović a kol. (2016). Tyto výsledky jsou důkazem citlivost spermatagonií na odlišné koncentrace. Naskytuje se tak mnoho možností pro budoucí optimalizace protokolů kryoprezervace.  $\text{Me}_2\text{SO}$  v 3M koncentraci vykazovalo nižší přežití než koncentrace 2M a 2,5M, ale stále ne nejhorší. Zajímavé je, že vyšší koncentrace (3M)  $\text{Me}_2\text{SO}$  jediná prokazovala stejné výsledky, co se životaschopnosti spermatagonií týče, při vyšších rychlostech zamrazování a to, i při zamrazovací rychlosti  $-10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Dále se testovalo několik rychlostí zamrazování za použití speciálního mrazáku. Nakonec v testu vyšlo nejlépe zamrazování rychlostí  $-1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . Důvodem může být velikost buněk, kde platí, že větší buňky potřebují pomalejší zamrazování, protože dochází k úniku vody z buněk. Nejvyšší životaschopnost byla dosažena při nejpomalejším zamrazování ( $0,5 - 1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ). Tato rychlost zamrazování se navíc osvědčila i z toho důvodu, že lze pro zamrazování použít pouze speciální zmrazovací boxy (CoolCell box) s danou rychlostí zamrazování, která je pro tyto boxy právě  $-1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  při vložení do  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  mrazáku. Po úplném dosažení teploty  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , což trvá přibližně 3 hodiny, pak musí být vzorky přemístěny do tekutého dusíku, kde mohou být uchovány, pravděpodobně v řádu let bez ztráty životaschopnosti (Lee a Yoshizaki, 2016).

Vhodná velikost zamrazované tkáně byla testována, hlavně z praktického důvodu, na 100 mg. Zmenšíme tím nároky na prostor pro uložení vzorků v tekutém dusíku a šetříme i materiál. Mezi dvěma testovanými velikostmi (50, 100, 150 mg) nebyly zjištěny výrazné rozdíly v přežití. Stejně je tomu tak u doby ekvibrace, neboli inkubačního času. Součástí experimentu bylo i porovnání vlivu přidávaných cukrů o různé koncentraci na přežití buněk. Stejně jako u velikosti tkáně ani cukry nevykazovaly statistické rozdíly, nejde tedy říci, že by jeden cukr byl pro kryomedium nejvhodnější. Ovšem z praktického hlediska

budeme spíše volit glukózu, která má v případě tohoto testování nejlepší výsledky přežití kryoprezervovaných buněk a zároveň disponuje nižší cenou, než například trehaloza, která je sice v oblasti kryoprezervace velmi používaným cukrem (Dash a kol., 2008; Pan a kol., 2010), ale nevýhodou je právě její vyšší prodejní cena.

Druhá část práce byla zaměřená na transplantaci spermatogonií do larev náhradních rodičů, v tomto případě do larev karase zlatého. Hlavní výhodou této náhradní reprodukce je, že si můžeme zvolit nejvýhodnějšího recipienta. V tomto případě karase zlatého, který je, oproti kapru obecnému, menšího vzrůstu, tím pádem snižuje nároky na prostor pro odchov, současně má obdobnou reprodukční charakteristiku (Brzuska, 2014) a v neposlední řadě je karas zlatý odolný vůči koi herpes viru (Sadler a kol., 2008). Náhradní rodiče, nesoucí zárodečné buňky kapra, tak nebudou tímto virem ohroženi. V jiných studiích se ovlivnění může týkat například zkrácení reprodukční doby (Takeuchi a kol., 2004; Yamaha a kol., 2007; Pšenička a kol., 2015).

Sterilita recipientů byla jedním z hlavních faktorů pro úspěšnou transplantaci. Výsledky sterilizace po injekci *dnd* MO jsou stejné, jako uvedl ve své studii Goto a kol. (2012). Transplantované zárodečné buňky kolonizovaly zárodečnou rýhu a začaly gametogenezi celkem u 42,5 % (kryoprezervované spermatogonie) a 52,5 % (čerstvé spermatogonie) recipientů karase. Tyto výsledky korelují s výsledky studie z roku 2017 (Seki a kol., 2017), kde se ovšem autor zabýval jiným druhem, konkrétně medakou japonskou, nelze proto vyloučit možné mezidruhové odlišnosti.

Při následné disekci gonád u transplantovaných skupin byla často pozorována jen jedna vyvinutá gonáda, důvodem může být metoda transplantace, kdy se spermatogonie transplantují do peritoneální dutiny pouze z jedné strany, nemusí tedy dojít ke kolonizaci obou míst budoucích gonád.

Pro identifikaci chimér zárodečné linie se sledovala přítomnost RNA kapra. Jako marker pro RT PCR byl použit gen *vasa*. Stejně jako například ve studii, také zaměřené na karase zlatého, Goto a kol. (2012). Zjištění přítomnosti RNA kapra pomocí RT PCR potvrdilo, že po transplantaci spermatogonií probíhá v recipientech exprese *vasa* genu kapra. Klasické PCR by nám sice také potvrdilo přítomnost kapřích buněk, ovšem ne jen zárodečných, ale jakýchkoliv. Po disekci gonád byly pozorovány jak testes, tak ovaria, to znamená, že díky transplantaci spermatogonií od samce, můžeme teoreticky získat životaschopné potomstvo, které se bude skládat jak ze samců, tak ze samic. To prokazuje

sexuální plasticitu spermatogoniálních/ovariálních kmenových buněk popsanou již v několika studiích (Lee a kol., 2013; Yoshizaki a kol., 2010). V této práci bylo zastoupení mírně vyšší pro samce, můžeme z toho odvodit, že při transplantaci spermatogonií, se spermatogonie spíše drží jejich původního sexuálního určení.

Tato práce přináší protokol pro kryoprezervaci kapřích spermatogonií díky pomalému zamrazování a následné využití metody náhradních rodičů, kdy pomocí recipientů karase zlatého dochází k vytvoření chimér zárodečné linie, nesoucích zárodečné buňky kapra obecného. Výsledná životaschopnost kryoprezervovaných spermatogonií byla docílena vytvořením vhodného kryomédia skládajícího se z 2,5M dimethylsulfoxidu, rychlosti zamrazování  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , velikosti vzorku 100 mg, inkubační času, přidaného cukru 0,3M glukózy, 1,5% BSA a 25nM Hapes rozpuštěného v PBS. Zároveň bylo prokázáno, že není nutné používat nákladné přístroje s programovatelnou rychlostí mrazení, ale postačí box s deklarovanou zmrazovací rychlostí, který se tak stává vhodnou alternativou pro pomalé zamrazování spermatogoniálních kmenových buněk. Rozmrazené kryoprezervované spermatogonie byly transplantovány do recipientů, u kterých byla následně ve věku 3 měsíců provedena disekce. Výsledky tohoto protokolu poskytují novou metodu pro chovné programy kapra za použití kryoprezervace spermatogonií, spolu s následnou obnovou reprodukce pomocí náhradních rodičů.

## 6 Závěr

Tato práce nabízí optimální protokol pro kryoprezervaci kapřích samčích zárodečných buněk – spermatogonií, za pomoci pomalého zmrazování spolu s následným obnovením metodou náhradních rodičů v podobě karase zlatého. Životaschopnost kryoprezervovaných spermatogonií byla zvýšena na více jak 40% díky faktorům jako správný výběr vhodného kryoprotektantu, zvolení vhodné rychlosti zmrazování, velikost tkáně pro zamrazování, inkubační čas a také přidání cukru o dané koncentraci. Velmi důležité je, že tato práce dokazuje, že kryoprezervace spermatogonií může být snadno aplikována i bez nutnosti využití specializovaných a nákladných mrazáků a přístrojů, ale že pro pomalé zamrazování stačí zmrazovací boxy s deklarovanou rychlostí zmrazování - 1 °C/min při vložení do - 80 °C mrazáku.

Úspěšnost transplantace byla hodnocena 3 měsíce po transplantaci. Transplantované spermatogonie se dokázaly vyvinout jak v ovaria, tak v testes. Výsledky mohou poskytovat alternativní přístup v chovných programech pro kryoprezervaci samčích zárodečných buněk spolu s karasem zlatým, jako vhodným recipientem. Budoucí studie se bude týkat optimalizace náhradní reprodukce a reprodukčních charakteristik karase zlatého, stejně tak, jako kryoprezervace samičích zárodečných buněk, což může být důležité, protože je to pravděpodobně jediná možnost, jak úspěšně zachovávat maternální genetickou informaci.

## 7 Seznam použité literatury

- Arai, K., Wilkins, N.P., 1987. Triploidization of brown trout (*Salmo trutta*) by heat shocks. *Aquaculture* 64, 97–103.
- Babiak, I., Glogowski, J., Brzuska, E., Adamek, J., 1997. Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. 567–571.
- Berghmans, S., Morris, J.P., Kanki, J.P., Look, A.T., 2004. Zebrafish Sperm Cryopreservation (The Zebrafish: Genetics, Genomics, and Informatics). *Methods Cell Biol.* 77, 645–659.
- Best, B.P., 2015. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res.* 18, 422–436.
- Billard, R., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species (1) - document. *Reprod. Nutr. Dev.* 877–920.
- Bozkurt, Y., Yildiz, C., Yavaş, I., 2014. Vitrification of common carp (*Cyprinus Carpio*) spermatozoa, post-thaw sperm quality, and fertility. *Isr. J. Aquac. - Bamidgeh* 66.
- Braat, A., Speksnijder, J.E., Zivkovic, D., 1999. Germ line development in fishes. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 745–60.
- Braat, A.K., Zandbergen, T., Van De Water, S., Goos, H.J.T.H., Zivkovic, D., 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of *vasa* RNA. *Dev. Dyn.* 216, 153–167.
- Brinster, R.L., Zimmermann, J.W., 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 11298–11302.
- Brown, L.A., Richards, R.H., 1979. Surgical gonadectomy of fish: a technique for veterinary surgeons. *Vet. Rec.* 104, 215 LP-215.
- Brzuska, E., 2014. Characteristics of the reproduction effectiveness of four Hungarian breeding lines of carp *Cyprinus carpio* (L.). *Aquac. Int.* 22, 149–158.
- Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., Herráez, M.P., 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: Application to large scale fertilization. *Aquaculture* 201, 301–314.
- Ciruna, B., Weidinger, G., Knaut, H., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E., Schier, A.F., 2002. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14919–14924.
- Dash, S., Routray, P., Dash, C., Guru, B., Swain, P., Sarangi, N., 2008. Use of the non-toxic cryoprotectant trehalose enhances recovery and function of fish embryonic stem cells following cryogenic storage. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 3, 277–287.
- Draper, B.W., McCallum, C.M., Moens, C.B., 2007. *Nanos1* Is Required To Maintain Oocyte Production in Adult Zebrafish. *Dev. Biol.* 305, 589–598.

- Dunham, R., 2004. Aquaculture and Fisheries Biotechnology. Genetic Approaches, Journal of Chemical Information and Modeling.
- Flajšhans, M., 2013. Genetika a šlechtění ryb. 2., rozš. a upr. vyd. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany vod. ISBN 978-80-87437-48-3.
- Fujimoto, T., Kataoka, T., Sakao, S., Saito, T., Yamaha, E., Arai, K., 2006. Developmental Stages and Germ Cell Lineage of the Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Zoolog. Sci. 23, 977–989.
- Fujimoto, T., Nishimura, T., Goto-Kazeto, R., Kawakami, Y., Yamaha, E., Arai, K., 2010. Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 17211–17216.
- Golpour, A., Siddique, M.A.M., Siqueira-Silva, D.H., Pšenička, M., 2016. Induced sterility in fish and its potential and challenges for aquaculture and germ cell transplantation technology: A review. Biol. 71, 853–864.
- 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.
- Goto-Kazeto, R., Saito, T., Takagi, M., Arai, K., Yamaha, E., 2010. Isolation of teleost primordial germ cells using flow cytometry. Int. J. Dev. Biol. 54, 1487–92.
- Goto, R., Saito, T., Takeda, T., Fujimoto, T., Takagi, M., Arai, K., Yamaha, E., 2012. Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish. Dev. Biol. 370, 98–109.
- Gross-Thebing, T., Yigit, S., Pfeiffer, J., Reichman-Fried, M., Bandemer, J., Ruckert, C., Rathmer, C., Goudarzi, M., Stehling, M., Tarbashevich, K., Seggewiss, J., Raz, E., 2017. The vertebrate protein dead end maintains primordial germ cell fate by inhibiting somatic differentiation. Dev. Cell 43, 704–715.e5.
- Guan, M., Rawson, D.M., Zhang, T., Marlings, G., 2010. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification 31, 230–238.
- Hara, A., Hiramatsu, N., Fujita, T., 2016. Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. Fish. Sci. 82, 187–202.
- Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E., Schartl, M., 2007. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). BMC Dev. Biol. 7, 3.
- Hiemstra, S.J., Lende, T. Van Der, Woelders, H., 2005. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources. Role Biotechnol. 25–36.
- Higaki, S., Eto, Y., Kawakami, Y., Yamaha, E., Kagawa, N., Kuwayama, M., Nagano, M., Katagiri, S., Takahashi, Y., 2010a. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing

- germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. *Reproduction* 139, 733–740.
- Higaki, S., Mochizuki, K., Akashi, Y., Yamaha, E., Katagiri, S., Takahashi, Y., 2010b. Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Reprod. Dev.* 56, 212–218.
- Ho, R.K., Kimmel, C.B., 1993. Commitment of cell fate in the early zebrafish embryo. *American Association for the Advancement of Science Stable*
- Hofmann, M.-C., Braydich-Stolle, L., Dym, M., 2005. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Dev. Biol.* 279, 114–24.
- Hong, N., Li, M., Yuan, Y., Wang, T., Yi, M., Xu, H., Zeng, H., Song, J., Hong, Y., 2016. Dnd is a critical specifier of primordial germ cells in the medaka fish. *Stem Cell Reports* 6, 411–421.
- Hong, Y., Winkler, C., Scharl, M., 1998. Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3679–84.
- Hořejší, V., Bartůňková J., 2009. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.
- Ito, L.S., Takahashi, C., Yamashita, M., Strüssmann, C.A., 2008. Warm water induces apoptosis, gonadal degeneration, and germ cell loss in subadult pejerrey *Odontesthes bonariensis* (*Pisces, Atheriniformes*). *Physiol. Biochem. Zool.* 81, 762–774.
- Jalabert, B., 2005. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals, *Reproduction, nutrition, development*.
- Jongens, T.A., Ackerman, L.D., Swedlow, J.R., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1994. Germ cell-less encodes a cell type-specific nuclear pore-associated protein and functions early in the germ-cell specification pathway of *Drosophila*. *Genes Dev.* 8, 2123–2136.
- Kagawa, H., 2013. Oogenesis in Teleost Fish. *Aqua-BioScience Monogr.* 6, 99–127.
- Kawakami, Y., Goto-Kazeto, R., Saito, T., Fujimoto, T., Higaki, S., Takahashi, Y., Arai, K., Yamaha, E., 2010. Generation of germ-line chimera zebrafish using primordial germ cells isolated from cultured blastomeres and cryopreserved embryoids. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1491–1499.
- Kedde, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Vrielink, J.A.F.O., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Ørom, U.A., Lund, A.H.H., Perrakis, A., Raz, E., Agami, R., 2007. RNA-Binding protein Dnd1 inhibits MicroRNA access to target mRNA. *Cell* 131, 1273.
- Khosla, K., Wang, Y., Hagedorn, M., Qin, Z., Bischof, J., 2017a. Gold nanorod induced warming of embryos from the cryogenic state enhances viability. *ACS Nano* 11, 7869–7878.

- Kise, K., Yoshikawa, H., Sato, M., Tashiro, M., Yazawa, R., Nagasaka, Y., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2012. Flow-cytometric isolation and enrichment of teleost type a spermatogonia based on light-scattering properties. *Biol. Reprod.* 86, 1–12.
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2007. Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 207–213.
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., 2003. Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 479–480.
- Kobayashi, T., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., 2004. Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 91–100.
- Koç, N.D., Yüce, R., 2012. A light- and electron microscopic study of primordial germ cells in the zebra fish (*Danio rerio*). *Biol. Res.* 45, 331–336.
- Kosaka, K., Kawakami, K., Sakamoto, H., Inoue, K., 2007. Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. *Mech. Dev.* 124, 279–289.
- Kutluyer, F., Kocabas, M., 2016. Use of Amino Acids in Fish Sperm Cryopreservation: A Review. *Austin Biol* 1, 1–4.
- Lacerda, S., Batlouni, S., Silva, S., Homem, C., França, L., 2006. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Anim Reprod* 3, 146–159.
- Lacerda, S., Costa, G., Campos-Junior, P., 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 Physiol. Biochem.* 39, 3–11.
- Lacerda, S.M. dos S.N., Costa, G.M.J., de França, L.R., 2014. Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *Gen. Comp. Endocrinol.* 207, 56–65.
- Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., França, L.R., Schulz, R.W., 2009. Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biol. Reprod.* 81, 177–187.
- Le Menn, F., Cerdà, J., Babin, P.J., 2007. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles, in: *The Fish Oocyte*. Springer, pp. 1–37.
- Lee, S., Iwasaki, Y., Shikina, S., Yoshizaki, G., 2013. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1640–1645.
- Lee, S., Yoshizaki, G., 2016. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology* 72, 165–168.
- Li, B., Sun, G., Sun, H., Xu, Q., Gao, B., Zhou, G., Zhao, W., Wu, X., Bao, W., Yu, F., Wang, K., Chen, G., 2008. Efficient generation of transgenic chickens using the spermatogonial stem cells *in vivo* and *ex vivo* transfection. *Sci. China Ser. C Life Sci.* 51, 734–742.



- Lin, S., Long, W., Chen, J., Hopkins, N., 1992. Production of germ-line chimeras in zebrafish by cell transplants from genetically pigmented to albino embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4519–4523.
- 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., Havelka, M., Pšenička, M., Flajšhans, M., 2018. Interspecific hybridization of sturgeon species affects differently their gonadal development. *Czech J. Anim. Sci.* 63, 1–10.
- 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 J. Anim. Sci.* 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., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367–389.
- Ma, C., Fan, L., Ganassin, R., Bols, N., Collodi, P., 2001. Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2461–2466.
- Macleán, N., Hwang, G., Molina, A., Ashton, T., Muller, M., Rahman, M.A., Iyengar, A., 2003. Reversibly-Sterile Fish Via Transgenesis 1–3.
- Magnotti, C., Cerqueira, V., Lee-Estevez, M., Farias, J.G., Valdebenito, I., Figueroa, E., 2016. Cryopreservation and vitrification of fish semen: A review with special emphasis on marine species. *Rev. Aquac.*
- Magyary, I., Dinnyes, A., Patakiné Várkonyi, E. Várkonyi, E., Szabó, R., Váradi, L., 1995. Cryopreservation of fish embryos and embryonic cells, *Aquaculture*.
- 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. *Gen. Comp. Endocrinol.* 245, 77–83.
- Marlow, F., 2015. Primordial Germ Cell Specification and Migration. *F1000Research* 4, 1–14.
- Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247, C125–C142.
- McClusky, L.M., 2012. Coordination of spermatogenic processes in the testis: Lessons from cystic spermatogenesis. *Cell Tissue Res.* 349, 703–715.
- Molyneaux, K., Wylie, C., 2004. Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 537–544.
- Morita, T., Kumakura, N., Morishima, K., Mitsuboshi, T., Ishida, M., Hara, T., Kudo, S., Miwa, M., Ihara, S., Higuchi, K., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2012. Production of donor-derived

- offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)1. Biol. Reprod. 86.
- Motono, M., Ohashi, T., Nishijima, K.I., Iijima, S., 2008. Analysis of chicken primordial germ cells. Cytotechnology 57, 199–205.
- Muchlisin, Z. a. a, 2005. Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. biodiversitas 6, 66–69.
- Nagano, M., Brinster, R.L., 1998. Spermatogonial transplantation and reconstitution of donor cell spermatogenesis in recipient mice. APMIS 106, 47.
- Nagasawa, K., Fernandes, J.M.O., Yoshizaki, G., Miwa, M., Babiak, I., 2013. Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo salar*: Characterization of *vasa*, *dead end*, and lymphocyte antigen 75 genes. Mol. Reprod. Dev. 80, 118–131.
- Nam, Y.K., Kim, D.S., 2004. Ploidy status of progeny from the crosses between tetraploid males and diploid females in mud loach (*Misgurnus mizolepis*). Aquaculture 236, 575–582.
- Nóbrega, R.H., Greebe, C.D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L.R., Schulz, R.W., 2010. Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. PLoS One 5, 1–16.
- Okutsu, T., Shikina, S., Sakamoto, T., Mochizuki, M., Yoshizaki, G., 2015. Successful production of functional Y eggs derived from spermatogonia transplanted into female recipients and subsequent production of YY supermales in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 446, 298–302.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2006a. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 2725–2729.
- Okutsu, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2008. Spermatogonial transplantation in fish: production of trout offspring from salmon parents. Fish. Glob. Welf. Environ. 209–219.
- Okutsu, T., Yano, A., Nagasawa, K., Shikina, S., Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2006b. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. J. Reprod. Dev. 52, 685–693.
- Opstad, I., Fjellidal, P.G., Karlsen, Ø., Thorsen, A., Hansen, T.J., Taranger, G.L., 2013. The effect of triploidization of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) On survival, growth and deformities during early life stages. Aquaculture 388–391, 54–59.
- Palmer, P.J., Blackshaw, A.W., Garrett, R.N., 1993. Successful fertility experiments with cryopreserved spermatozoa of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using dimethylsulfoxide and glycerol as cryoprotectants. Reprod. Fertil. Dev. 5, 285–293.

- Pan, J., Shen, H., Luo, Y., 2010. Cryoprotective effects of trehalose on grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) surimi during frozen storage. *J. Food Process. Preserv.* 34, 715–727.
- Peruzzi, S., Kettunen, A., Primicerio, R., Kaurić, G., 2007. Thermal shock induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquac. Res.* 38, 926–932.
- Produkce a trh ryb. *Rybářské sdružení České republiky* – [online]. Dostupné z: <http://www.cz-ryby.cz/tables-show/>
- Pšenička, M., Saito, T., Linhartová, Z., Gazo, I., 2015. Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology* 83, 1085–1092.
- 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, 119–122.
- Rall, W.F., Fahy, G.M., 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 313, 573–575.
- Raz, E., 2003. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nat. Rev. Genet.* 4, 690–700.
- Reading, B.J., Sullivan, C.V., Schilling, J., 2017. Vitellogenesis in fishes, reference module in life sciences. Elsevier Ltd.
- Reichel, A., Rakers, S., Gebert, M., 2014. Effects of different cryoprotectants during cryopreservation of fish eggs. *Cryobiology* 69, 521.
- Richardson, B.E., Lehmann, R., 2015. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms 11, 37–49.
- Robles, V., Riesco, M.F., Psenicka, M., Saito, T., Valcarce, D.G., Cabrita, E., Herráez, P., 2017. Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. *Aquaculture*.
- Sadler, J., Marecaux, E., Goodwin, A.E., 2008. Detection of koi herpes virus (CyHV-3) in goldfish, *Carassius auratus* (L.), exposed to infected koi. *J. Fish Dis.* 31, 71–72.
- Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue, K., Tanaka, M., Arai, K., Yamaha, E., 2006. Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 691–700.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., Yamaha, E., 2010. Interspecies transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1479.
- Saito, T., Guralp, H., Iegorova, V., Rodina, M., Psenicka, M., 2018. Elimination of primordial germ cells in sturgeon embryos by UV-irradiation. *Biol. Reprod.* ioy076-ioy076.

- Saito, T., Psenicka, M., 2015. Novel technique for visualizing primordial germ cells in sturgeons (*Acipenser ruthenus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. baerii*, and *Huso huso*). *Biol. Reprod.* 93, 96.
- Saito, T., Pšenička, M., Goto, R., Adachi, S., Inoue, K., Arai, K., Yamaha, E., 2014. The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons. *PLoS One* 9, e86861.
- Saitou, M., 2009. Germ cell specification in mice. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 386–395.
- Santos, A.C., Lehmann, R., 2004. Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr. Biol.* 14, 578–589.
- 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. *Sci. Rep.* 7, 1–11.
- Shang, M., 2013. Isolation, identification, culture, cryopreservation, genetic transformation and transplantation of catfish germline stem cells. A Diss. Grad. Fac. Auburn Univ.
- Schulz, Rüdiger W., and T.M., 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol. Biochem.* 26, 43–56.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411.
- Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W.F., 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim. Reprod. Sci.* 169, 2–5.
- Streit Jr, D.P., Godoy, L.C., Ribeiro, R.P., Fornari, D.C., M.D. and T.Z., 2014. Cryopreservation of Embryos and Oocytes of South American Fish Species.
- Strüssmann, C.A., Saito, T., Takashima, F., 1998. Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 119, 637–644.
- Summerton, J.E., 2007. Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 651–660.
- Takeuchi, Y., 2003. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol. Reprod.* 69, 1142–1149.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., 2004. Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids. *Nature* 430, 629–30.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., 2001. Production of germ-line chimeras in rainbow trout by blastomere transplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 380–389.
- Tiersch, T.R., Yang, H., Jenkins, J. a, Dong, Q., 2007. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 493–508.
- Uribe, M.C., Grier, H.J., Mejía-Roa, V., 2014. Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. *Spermatogenesis* 4, e983400.

- Van Eenennaam, J.P., Stocker, R.K., Thiery, R.G., Hagstrom, N.T., Doroshov, S.I., 1990. Egg fertility, early development and survival from crosses of diploid female  $\times$  triploid male grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture* 86, 111–125.
- Wakamatsu, Y., 1993. Generation of germ-line chimeras in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol Mar Biol Biotechnol* 2, 325–332.
- Wargelius, A., Leininger, S., Skaftnesmo, K.O., Kleppe, L., Andersson, E., Taranger, G.L., Schulz, R.W., Edvardsen, R.B., 2016. Dnd knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. *Sci. Rep.* 6, 1–8.
- Warren, S., 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *curr. protoc. immunol.* 21, A.3B.1-A.3B.2.
- Weidinger, G., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-badge, R., Thisse, C., Thisse, B., Raz, E., Fries, L., 2003. dead end , a novel vertebrate germ plasm component , is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival 13, 1429–1434.
- Weidinger, G., Wolke, U., Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., Raz, E., 2002. Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. *Development* 129, 25–36.
- Wong, T.-T., Saito, T., Crodian, J., Collodi, P., 2011. Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae1. *Biol. Reprod.* 84, 1190–1197.
- Xin, M., Siddique, M.A.M., Dzyuba, B., Cuevas-Urbe, R., Shaliutina-Kolešová, A., Linhart, O., 2017. Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. *Theriogenology* 98, 16–22.
- Xu, H.Y., Li, M.Y., Gui, J.F., Hong, Y.H., 2010. Fish germ cells. *Sci. China Life Sci.* 53, 435–446.
- 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.
- Yamaha, E., Murakami, M., Hada, K., Otani, S., Fujimoto, T., Tanaka, M., Sakao, S., Kimura, S., Sato, S., Arai, K., 2003. Recovery of fertility in male hybrids of a cross between goldfish and common carp by transplantation of PGC (primordial germ cell) -containing graft 121–131.
- Yamaha, E., Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., 2007. Developmental biotechnology for aquaculture, with special reference to surrogate production in teleost fishes. *J. Sea Res.* 58, 8–22.
- Yang, X., Yue, H., Ye, H., Li, C., Wei, Q., 2015. Identification of a germ cell marker gene, the dead end homologue, in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*. *Gene* 558, 118–125.

- Yano, A., Suzuki, K., Yoshizaki, G., 2008. Flow-Cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biol. Reprod.* 78, 151–158.
- Yön, N.D., Akbulut, C., 2015. Identification of primordial germ cells: Cytological, histological and immunohistochemical aspects. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 58, 222–228.
- Yoon, C., Kawakami, K., Hopkins, N., 1997. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124, 3157–65.
- 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 Physiol. Biochem.* 26, 3–12.
- Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., Takeuchi, T., 2003. Primordial germ cell: A novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 453–457.
- Zou, J., Wei, X., 2010. Transplantation of GFP-expressing blastomeres for live imaging of retinal and brain development in chimeric zebrafish embryos 3–5.

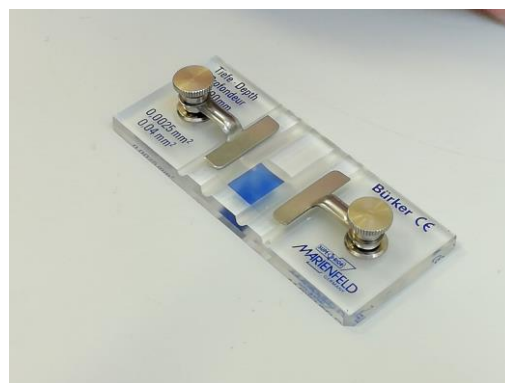
## 8 Přílohy



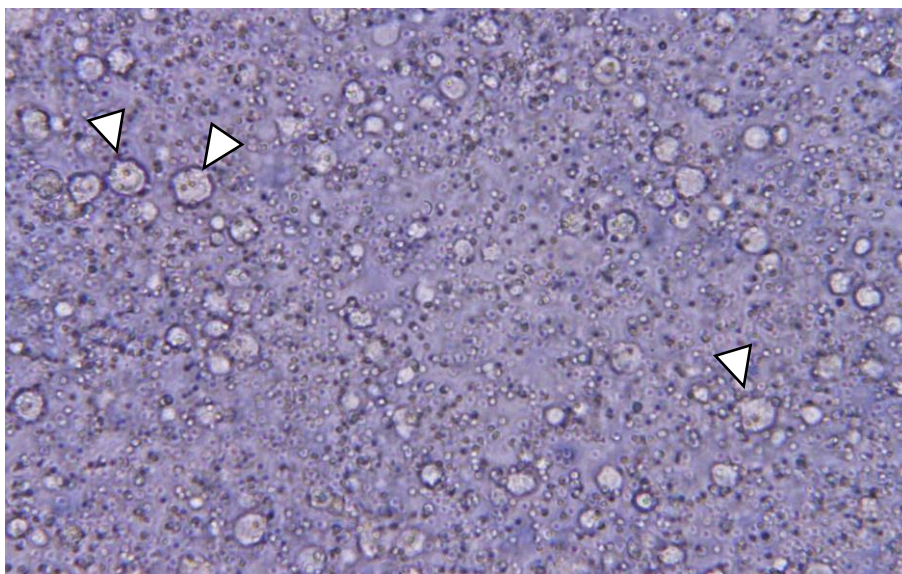
Příloha 1: Donor spermatogonií kapr obecný (1 rok starý, váha  $128 \pm 41$ g), před disekcí gonád (bílá šipka)



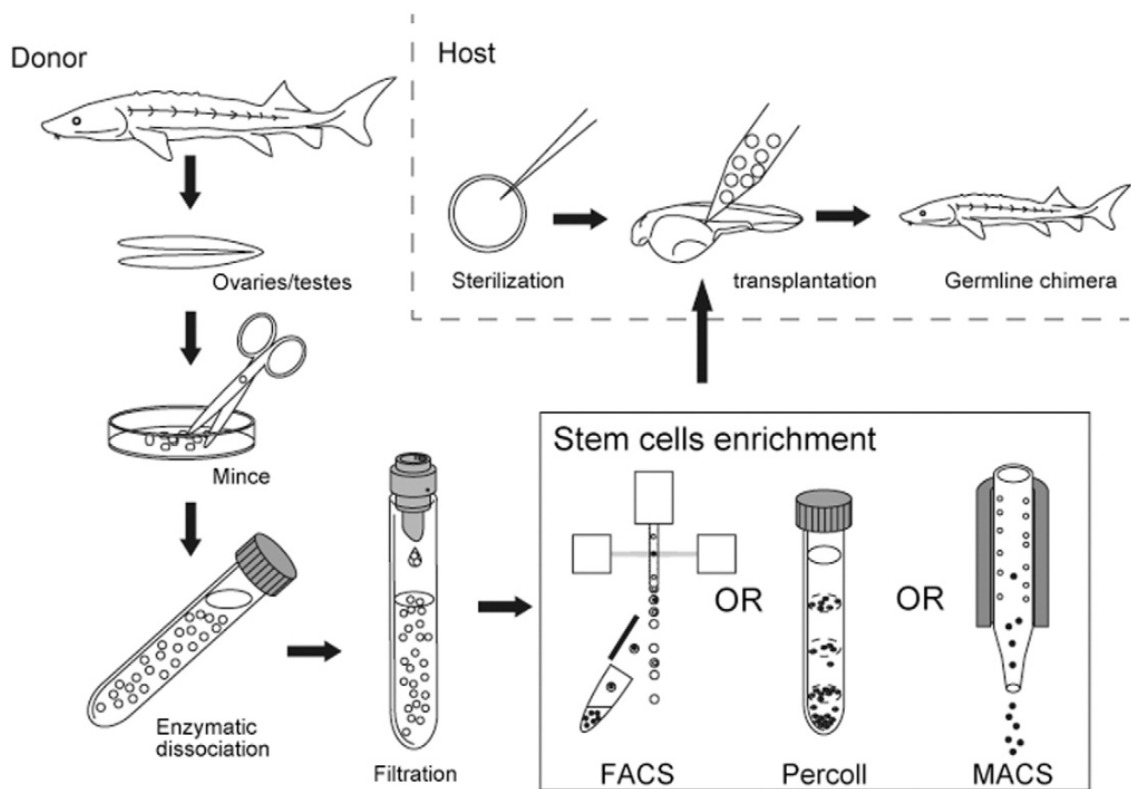
Příloha 2: Izolované testes kapra obecného



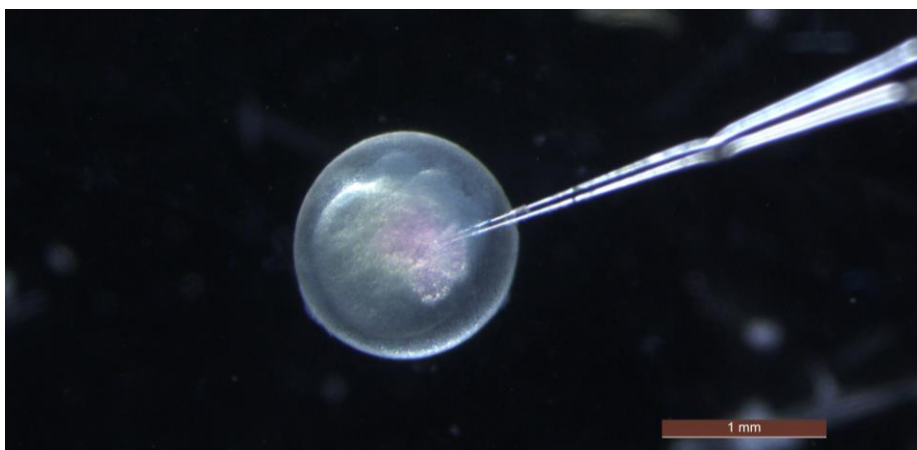
Příloha 3: Bürkerova komůrka pro počítání živých/mrtvých buněk



Příloha 4: Snímek suspenze buněk použité k transplantaci (spermatogonie – označeny bílou šipkou, menší spermatocyty a nejmenší spermatidy) z testes kapra obecného; obarvené Trypanovou modří; při zvětšení 40x

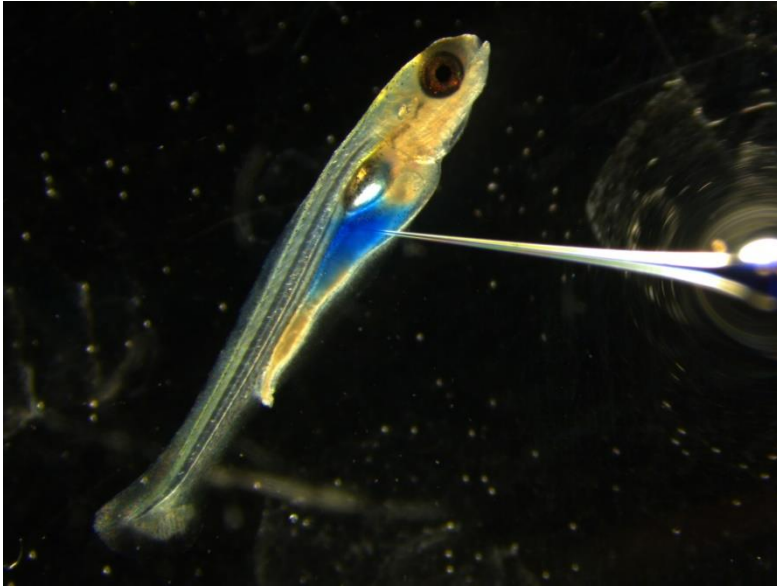


*Príloha 5: Schéma izolace a transplantace spermatogonií u ryb. Prvně dojde k vyjmutí testes z donora, testes jsou následně rozstříhány na malé části, které jsou za pomoci enzymů disociovány. Po disociaci se suspenze buněk filtruje a poté sortuje. Sortování spermatogonií je možné několika způsoby – FACS průtokovou cytometrií, Percoll gradientem, nebo díky magneticky aktivovanému třídění buněk (MACS); převzato a upraveno podle Robles a kol., (2017)*



*Príloha 6: Injikace embryí karase zlatého pomocí dnd MO pro zajištění sterilizace*





*Příloha 7: Transplantace spermatogonií kapra obecného do sterilních larev karase zlatého*

## 9 Abstrakt

### Kryoprezervace a transplantace spermatogonií kapra obecného

Kryoprezervace a transplantace zárodečných buněk u ryb poskytuje vhodný nástroj pro zachování genetické informace. Metodou náhradních rodičů lze získat potomstvo se znaky zvoleného donora, v tomto případě komerčně důležitého, kapra obecného. Pro úspěšnou kryoprezervaci zárodečných buněk ryb ale musí být stanovený vhodný protokol individuálně pro každý druh. V případě této práce se testovalo několik kryoprotektantů. U nejlepšího z nich,  $\text{Me}_2\text{SO}$ , co se životaschopnosti spermatogonií týče, se testovaly jeho různé koncentrace v závislosti na rychlosti zamrazování. Dále následovalo testování vlivu velikosti zamrazované tkáně, inkubačního času a přidaného cukru. Výsledkem testování bylo kryomedium sestávající se z 2,5M dimethylsulfoxidu, přidaného cukru 0,3M glukózy, 1,5% BSA a 25nM HEPES rozpuštěného v PBS. Jako nejvhodnější byla stanovena velikost zamrazované tkáně 100 mg, inkubační čas 30 min a rychlost zamrazování  $-1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . Tento výsledek zajišťuje nejvyšší míru přežití kryoprezervovaných spermatogonií kapra obecného a nabízí optimální podmínky pro jejich zamrazování. Druhou částí práce bylo ověření úspěšnosti transplantace kryoprezervovaných a i čerstvých spermatogonií do vhodně zvoleného recipienta, jímž je karas zlatý, který s kaprem obecným sdílí obdobné reprodukční charakteristiky, ale zároveň nabízí i snížení nároků na prostor, nebo odolnost vůči koi-herpes viru. Transplantované zárodečné buňky kolonizovaly zárodečnou rýhu a spustily gametogenezi celkem u 42,5 % (kryoprezervované spermatogonie) a 52,5 % (čerstvé spermatogonie) recipientů karase zlatého, což prokázalo, že transplantace kryoprezervovaných spermatogonií kapra obecného, do recipienta karase zlatého, je úspěšně realizovatelná.

Klíčová slova: zárodečné buňky, transplantace, kryoprezervace, spermatogonie, kapr obecný, recipient, donor

## **10 Abstract**

### **Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia**

Cryopreservation and transplantation of germ cells in fish provides a suitable tool for preserving genetic information. By method of surrogate reproduction, the offspring with characters of the chosen donor can be obtained. In this case of our commercially important species common carp. However, for the successful cryopreservation of the germ cells, a suitable protocol for each species must be established. Several cryoprotectants were tested. The best of them, Me<sub>2</sub>SO, regarding the viability of spermatogonia, was tested for its different concentrations depending also on the rate of freezing. Further testing, related to the effect of tissue size, incubation time and added sugar, was performed. The result of the assay identified best cryomedium composed of 2.5M dimethylsulfoxide, added sugar of 0.3M glucose, 1.5% BSA and 25nM Hepes dissolved in PBS. The most suitable size of tissue was 100 mg, incubation time was 30 min and cooling rate was -1 ° C/min. This protocol ensures the highest viability rate of cryopreserved spermatogonia of common carp. The second part of the work was to verify the success of the transplantation of cryopreserved and fresh spermatogonia into a suitably chosen recipient, the goldfish, which shares similar reproductive characteristics with carp, but also offers reduction of space requirements or resistance to koi-herpes virus. The transplanted germ cells colonized the germ line and started gametogenesis in 42.5% (cryopreserved spermatogonia) and 52.5% (fresh spermatogonia) goldfish recipients, which demonstrated that the transplantation of cryopreserved spermatogonia of common carp can be successfully achieved.

Key words: germ cells, transplantation, cryopreservation, spermatogonia, common carp, recipient, donor