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

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

Chov dánia pruhovaného pro experimentální účely

R. Franěk, M. Pšenička

Vodňany, 2022

EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství

Vydání a tisk publikace byly uskutečněny v rámci Operačního programu Rybářství 2014–2020:
„Metodika XIII“ č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/20_017/0001091

Obsahová část metodiky je výsledkem řešení výzkumných projektů:
Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky – projekty CENAKVA (LM2018099) a Biodiverzita (Reprodukční a genetické postupy pro uchování biodiverzity ryb a akvakulturu) (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007370) – 50 %, Národní agentury pro zemědělský výzkum QK1910428 Uchovávání genetických zdrojů kapra obecného in vitro a tvorba isogenních linií pomocí transplantace zárodečných buněk – 50 %.

Edice Metodik

č. 188

ISBN 978-80-7514-138-5

OBSAH

1. CÍL METODIKY **7**

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY **7**

2.1. ÚVOD **7**

2.2. Biologie druhu **11**

2.3. Získání a převoz ryb **12**

2.3.1. Příjem a karanténa ryb 13

2.4. Chovné prostřední **16**

2.4.1. Teplota 16
2.4.2. Fotoperioda 17
2.4.3. Kvalita vody 17
2.4.4. Hustota obsádek 18
2.4.5. Zoohygiena 18

2.5. Rozmnožování v laboratoři **19**

2.5.1. Poloumělý výtěr 20
2.5.2. Umělý výtěr 23

2.6. Manipulace s embryi a jejich mikroinjikace **27**

2.6.1. Příprava před získáním jiker 28
2.6.2. Odstranění chorionu 29
2.6.3. Vlastní mikroinjikace 32

2.7. Odchov ryb **36**

2.8. Chromozomové manipulace **39**

2.8.1. Uniparentální dědičnost 39
2.8.2. Indukce polyploidních stavů 43

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ **46**

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY **46**

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY **47**

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY **47**

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE **50**

1. CÍL METODIKY

Metodika popisuje základní postupy pro chov nejpoužívanějšího rybího modelového organizmu – dánia pruhovaného (*Danio rerio*) v laboratorním prostředí za účelem využití ve výzkumu, ale i v ekotoxikologické praxi. Důraz je kladen na péči o dospělé ryby, jejich rozmnožování pomocí poloumělého, ale i umělého výtěru. Metodika dále popisuje inkubaci a odchov raných stadií a techniky pro jejich rozkrm a přípravu živé potravy. Zvládnutím těchto technik je možné minimalizovat ztráty v průběhu odchovu raných stadií, což může mít zásadní dopady například na minimalizaci potřeby počtu experimentálních zvířat.

Druhá část metodiky se věnuje technikám mikroinjikace, které jsou používány především pro funkční studie genů (například editace genomu, dočasné tlumení exprese) nebo pro tvorbu transgenních organizmů s expresí reportérových proteinů *in vivo*. V této části jsou popsány základní techniky, včetně následné péče o mikroinjikovaná embrya.

V poslední části metodiky jsou stručně popsány techniky chromozomových manipulací, zejména produkce haploidů, gynogenetických a androgenetických jedinců. Tyto techniky jsou zásadní pro screeningové studie mutací, ale také produkci izogenních linií, které jsou dále používány jako nástroj pro standardizaci genetického pozadí u experimentálních ryb.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

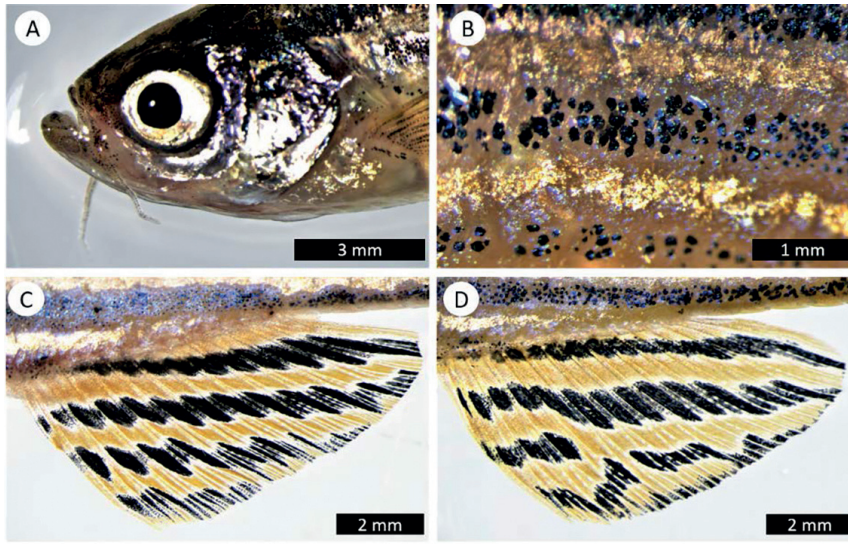
2.1. ÚVOD

Dánio pruhované je malá sladkovodní ryba s původním areálem výskytu v Jižní Asii, především Indii, Nepálu a Bangladéši v povodí Brahmaputry a Gangy. Samotný název ryby je odvozen z Bengálského slova *„dhani“* které v překladu znamená „z rýžového pole“, což jasně napovídá o místě výskytu této rybky (Spence a kol., 2008). Dánio pruhované je jedním z 27 známých zástupců rodu *Danio*, které dále řadíme do široké podrodiny Danioniae, s hlavním areálem výskytu v Asii a částečně v Africe. Souhrnně patří dánia mezi kaprovité, kteří reprezentují nejpočetnější rodinu obratlovců a v současné době jsou rozšířeni celosvětově (Engeszer a kol., 2007; Parichy, 2015).

První písemné zmínky o dániu pruhovaném se datují na začátek 19. století, kdy dánio pruhované bylo prvotně zařazeno jako *Brachydanio*. Nicméně pozdější dostupnost molekulárních nástrojů neodhalila rozdíly mezi *Danio* a *Brachydanio*, tudíž došlo k sjednocení na *Danio*, které je používané od počátku 20. století dodnes. Pro dánio pruhované je typické horní

postavení úst, kdy spodní čelist přesahuje horní a u dospělých jedinců jsou znatelné hmatové vousky (Obr. 1A). Tělo a stejně tak ocasní a řitní ploutev jsou charakteristické několika vodorovnými pruhy, které jsou mezi jednotlivými jedinci specifické a umožnují jejich individuální identifikaci (Obr. 1B, C, D).

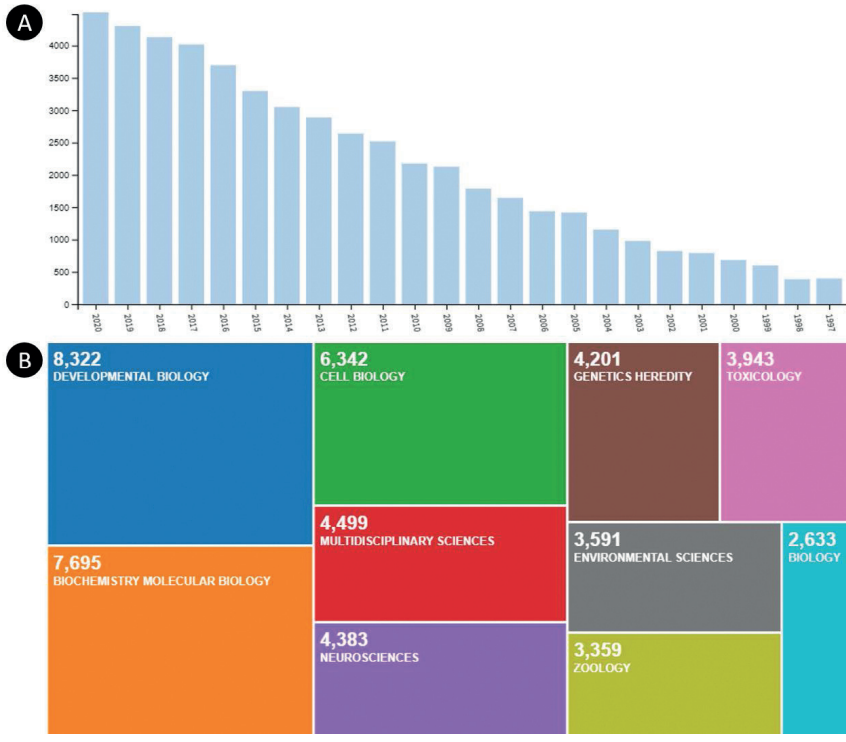
Mezi další typické tělesné znaky dánia pruhovaného patří maximální délka těla nepřesahující 50 mm, nízké tělo a zkrácená postranní čára. Pigment na těle je tvořen černými melanofory, modro-stříbrnými iridofory a žlutými xantofory, které dohromady tvoří charakteristické tmavě modré a žluté pruhy (Obr. 1 B), které daly vzniknout i anglickému názvu tohoto druhu – *„zebrafish"* (Singh a kol., 2016).



Obr. 1. *Charakteristické znaky dánia pruhovaného. A) horní postavení úst, je viditelný jeden pár vousků. B) povrch těla ryby s patrnými černými melanofory, modro-stříbrnými iridofory, které se prolínají v jednotlivých pruzích a jsou střídány zlatě žlutými xantofory. C a D) Detailní záběr na řitní ploutev dvou různých samců. Patrný je podobný vzorec pruhování jako na těle a individuální rozdíly v barevných vzorcích u obou samců (Foto: R. Franěk).*

V současné době lze dánio označit za nejpoužívanější rybí modelový organizmus v široké paletě vědních oborů (Obr. 2A, B). Dánio je zároveň v rámci nejpoužívanějších modelových obratlovců na třetím místě za myší a krysou. Historie využití dánia sahá až do 70. let minulého století, kdy byli do laboratorních chovů zavedeni první jedinci, z nichž byly následně

produkovány izogenní (klonální) linie (Streisinger a kol., 1981). Následovaly první pokusy o mutagenezi s přenosem po zárodečné linii (Chakrabarti a kol., 1983; Walker a Streisinger, 1983) a vnesení „cizí“ sekvence do genomu embrya pomocí mikroinjikace (Stuart a kol., 1988). Tyto studie položily základ rozsáhlým studiím, které pomocí mutageneze identifikovaly nepřeberné množství genů a jejich funkce (Driever a kol., 1996; Haffter a kol., 1996; Amsterdam a kol., 1999). Mezi další významné milníky, které upevnily pozici dánia jakožto jednoho z nejvýznamnějších modelových organizmů, patří detailní popis embryonálního vývoje (Kimmel a kol., 1995), osekvenování kompletního genomu v roce 2001 (Howe a kol., 2013), první studie popisující cílenou mutagenezi (Moens a kol., 2008) a dočasné tlumení exprese jednotlivých genů (Nasevicius a Ekker, 2000). Nelze ani opomenout zvládnutí a následné optimalizování nukleárního transferu (tzv. klonování) (Siripattarapravat a kol., 2009). V současné době je taktéž dostupný transkriptom embrya a dospělce (Vesterlund a kol., 2011; Lawson a kol., 2020) a stejně tak epigenom (Yang a kol., 2020). Mezi moderní milníky samozřejmě patří aplikace pokročilých nástrojů pro editaci genomu, které byly aplikovány i u ostatních modelových obratlovců v podstatě ve stejný čas (Ma a Liu, 2015). Což svědčí o tom, že dánio se z hlediska dostupných molekulárních nástrojů téměř vyrovnalo mnohem déle etablovaným modelovým druhům především z řad savčích obratlovců.



Obr. 2. *Význam a popularita dánia pruhovaného jako modelového obratlovce. A) Graf znázorňuje roční počty publikací – klíčové slovo „zebrafish" v databázi Web of Science. B) Deset vědních oborů s největším počtem publikací na dánio pruhované.*

Vysoká popularita míra využití dánia je dána také vysokou plodností, externím oplozením a rychlým vývojem téměř transparentního embrya (Teame a kol., 2019). Zároveň dánio představuje vhodný model pro studium vývoje a metabolizmu orgánů, které sdílí se savci. S jistými omezeními ve stavbě daných orgánů (rozdílná dýchací soustava, nepřítomnost kostní dřeně, dvoukomorové srdce atd.) může dánio nahradit modely myši a dalších savců využívaných ve výzkumu (Lieschke a Currie, 2007). Na dániu je tudíž možné například modelovat nemoci, které se vyskytují u „vyšších" obratlovců včetně člověka, se kterým dánio sdílí přibližně 70 % genů (jedná se o ortology, tj. geny dvou rozdílných druhů, které se vyvinuly z jednoho původního genu, a jejichž funkce je evolučně konzervovaná) (Howe a kol., 2013). Navíc existuje veřejně dostupné databáze sdružující dostupná data o jednotlivých genech, jejich fenotypech, indukovaných mutantních a transgenních liniích včetně nástrojů

pro jejich produkci, nebo pro přímé získání z mezinárodních živých bank, které se nacházejí v Německu, Spojených státech amerických a Číně (zfin.org) (Geisler a kol., 2017).

2.2. Biologie druhu

Teplotní optimum pro dánio pruhované se obvykle uvádí v rozmezí 25–28,5 °C. Nicméně je důležité zmínit, že v přirozeném prostředí Indického subkontinentu jsou ryby vystaveny značně proměnlivým podmínkám. Monzunové klima Indického subkontinentu způsobuje rozliv hlavních toků řek, kdy po následném snížení hladiny vody dochází k tvorbě oddělených malých vodních těles. Teplota vody v letních měsících dosahuje 38 °C, avšak v zimě klesá až na 6 °C. Preferovaným habitatem dánia pruhovaného jsou především stojaté či pomalé tekoucí vody, které mají obvykle vazbu na rýžová pole. Tyto habitaty poskytují poměrně dobrou ochranu před predátory, jelikož jejich dočasná izolace od hlavních toků během roku je pro větší druhy ryb nevýhodná. Nicméně mezi hlavní predátory patří hadohlavci a zástupci jehlicovitých, jejichž tělesné charakteristiky jim umožňují existenci právě i v mělkých vodách obývaných dániem. Dále jsou dokumentovány výskyty dánia v proudících řekách a potocích. Obecnou preferencí v jakémkoliv habitatu je výskyt spíš v příbřežních a mělčích partiích, s relativně nízkou průhledností vody (~ 30 cm), vegetací a expozicí slunci. Proměnlivá povaha přirozených habitatů se odráží i na širokém rozsahu pH vody, ve kterém se dánio vyskytuje (pH 6–10), o spíše nižší vodivosti nepřesahující 300 $\mu S.cm^{-1}$ (Engeszer a kol., 2007).

Dánio v rámci svojí výživy využívá prostor celého vodního sloupce, což indikuje i spektrum potravy v přirozeném prostředí, kde je všežravcem. Hlavní složkou potravy je zooplankton a hmyz, jehož larvální stadia jsou vázaná na vodní prostředí. Příležitostně konzumuje i bentické organizmy. Reprodukční biologie ve volné přírodě je značně vázána na měnící se prostředí, především z hlediska teploty vody a výšky hladiny sloupce. Současný stav poznání reprodukce ve volné přírodě je v zásadě nedostačující, jelikož toto téma bylo upozaděno právě významem dánia v laboratoři. Tudíž je poměrně obtížné vztahovat současné poznatky z výzkumu na volně žijící populace. Je nutné připomenout, že první jedinci dánia pruhovaného byli cíleně chováni v laboratořích více než před 50 lety. Lze tedy očekávat, že současní jedinci mohou představovat již dvoustou generaci (Whiteley a kol., 2011). Dohromady s krátkým generačním intervalem (3–4 měsíce) lze téměř s jistotou očekávat, že díky laboratorní selekci došlo až k extrémním posunům charakteristik druhu oproti volně žijícím populacím. Vhodným příkladem odlišnosti divokých a laboratorních populací je například popsání absence lokusu determinujícího pohlaví u dvou laboratorních linií (Wilson a kol., 2014).

V současné době je v rámci odborné literatury velké množství přehledů, které mají za cíl sumarizovat základní chovné podmínky a procedury, které jsou spojené s držením a používáním dánia v laboratoři. Nicméně dostupné informace nelze brát za závazné, spíše doporučující, jelikož je vždy nutné zohlednit vždy místní podmínky laboratorního chovu (například národní a institucionální legislativa, typ chovného systému) a hlavní účel, pro které je dánio chováno. Situace je dále komplikována skutečností, že dánio je, co se týče chovných podmínek, více než tolerantní druh, kdy je více než pravděpodobné, že bude prospívat v širokém rozmezí doporučovaných hodnot. Níže uvádíme sumarizovaný přehled, který je založen na doporučeních vydaných v rámci směrnice EU (Směrnice EU 2010/63 Článek 33 a Příloha III) literárních přehledech (Reed a Jennings, 2011; Aleström a kol., 2020) a volně dostupné knize „The Zebrafish Book" (Westerfield, 2007).

2.3. Získání a převoz ryb

Prvotní chovné hejno lze získat z mnoha zdrojů, nicméně považujeme za důležité zmínit, že nákup z běžných chovatelských obchodů nebo akvaristik je krajně nevhodný, jelikož je více než obtížné dohledat neznámou historii a původ daných ryb (Franěk a kol., 2020). V důsledku toho dochází k jevu, kdy jsou experimenty prováděny na organizmech bez bližší genetické charakteristiky. Tato situace není natolik závažná, pokud uvažujeme, že experimenty jsou v různém čase prováděny na stejné populaci v rámci dané laboratoře. Poměrně závažný problém nastává při snaze reprodukovat studii v rámci jiné laboratoře, kde je vysoce pravděpodobné, že disponuje dánii s kompletně odlišným genetickým profilem. Výsledkem je neopakovatelnost studie nebo získání výsledků, které ani vzdáleně neodpovídají těm původním. Tento problém je dále prohlouben nejednotnou, a v horším případě špatně používanou terminologií v odborných publikacích pro identifikaci původu dánií, které by za ideální situace měly být jasným vodítkem k jejich genotypu. Dánia bez známého původu bývají často označována jako „wild-type" (divoký typ), což by mohlo zdánlivě evokovat, že mají reprezentovat volně žijící populaci. V případě chovu v zajetí po desítky až stovky generací se ovšem jedná o naprosto mylnou představu. Podobně mylně je používáno i označení *„strain"* (kmen), které je v rámci savčích modelů striktně určeno pro inbrední kmeny. Inbredním kmenem rozumíme skupinu zvířat, která byla po více než 20 generací rozmnožována mezi sourozenci. Tudíž, v případě použití dánií bez známého původu (ale i jiných modelových druhů ryb), by mělo být explicitně uvedeno, že se opravdu jedná o neznámý původ s neznámým genetickým pozadím. Je zřejmé, že takovýto popis by do značné míry mohly diskvalifikovat danou studii. Proto je možné velmi často pozorovat, že autoři uvádějí použití kmene nebo linie, případně se uchylují k použití termínu *„wild-type"* což ale

neodpovídá nomenklatuře a prohlubuje již tak velký zmatek v označování původu a genetického pozadí pokusných dánií (Crim a Lawrence, 2021).

Pro získání chovného hejna je na národní úrovni možné oslovit laboratoře využívající a chovající dánia. V rámci České republiky neexistuje databáze slučující laboratoře využívající dánio jako modelový organizmus. Nicméně je možné v rámci odborné literatury dohledat vědecké skupiny v rámci České republiky, které na dániu pracují a ty přímo oslovit. V mezinárodním měřítku je možné dánia získat z center, která zasílají dané linie/kmeny obvykle jako vykulená a rozplavaná embrya. Centra se nacházejí v Německu, Spojených Státech Amerických a Číně. Ovšem je důležité upozornit na fakt, že podle naší legislativy musí dánio pruhované určené k pokusům pocházet ze zařízení oprávněného k chovu pokusných zvířat podle zákona č. 246/1992 Sb.

Pro samotný převoz je nutné respektovat biologické charakteristiky druhu (především teplotní a kyslíkové optimum) a stadium embryonálního vývoje. Z vlastní zkušenosti víme, že je možné zasílat embrya již po gastrulaci (Obr. 3A–C). V rámci krátkodobého transportu je možné převážet embrya ihned po oplození za předpokladu, že bude transport dokončen v průběhu blastuly. Je nevhodné zasílat embrya před dokončení gastrulace (Obr. 3D) kvůli jejich vysoké citlivosti (nemají uzavřený blastopor) a nemožnosti kompletně zabránit otřesům v průběhu manipulace a přepravy. Stejně tak je nevhodné zasílat embrya těsně před vykulením (starší 40 h), jelikož není možné je bezpečně povrchově dezinfikovat pomocí chlornanu sodného (2.6.1. Poloumělý výtěr), kdy je jejich chorion už velmi jemný, a právě díky otřesům v průběhu přepravy dochází i k předčasnému vykulení části jedinců (Obr. 3E–F).

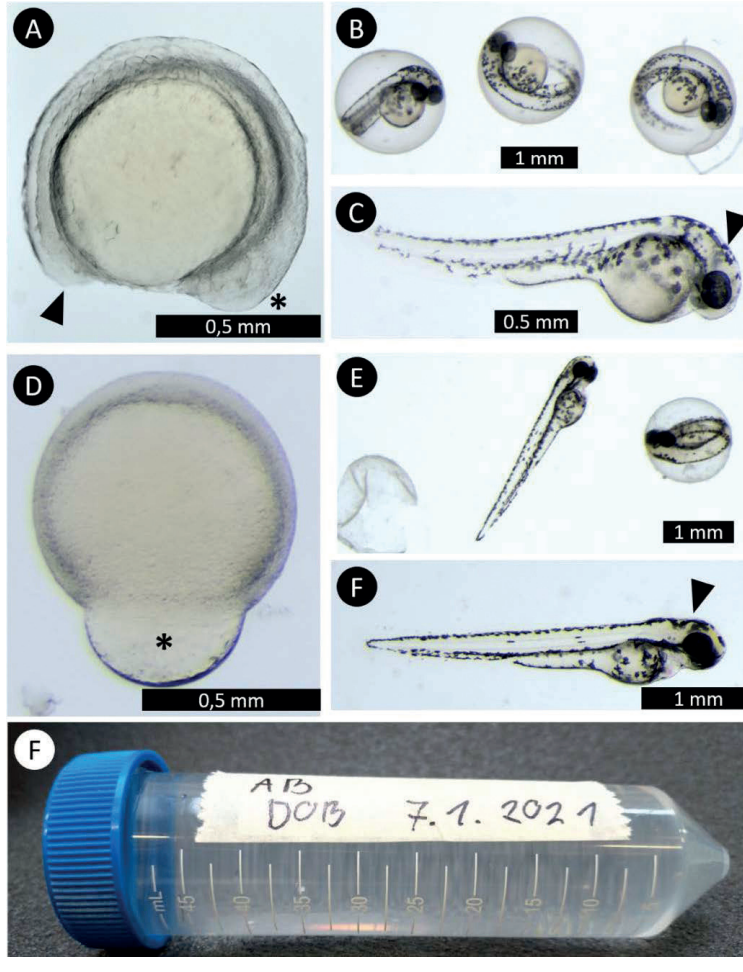
Embrya doporučujeme transportovat v nádobách menšího objemu, které jsou kompletně naplněné vodou, což brání výraznému pohybu vody, a tím i mechanickému poškození embryí (Obr. 3G). Stejným způsobem jsou obvykle transportovány i rozplavané larvy, ty ale již nejsou citlivé na otřesy. V případě ryb již aktivně přijímající potravu a vyšších stadií až po dospělce volíme převoz pod kyslíkovou atmosférou v uzavřených plastikových pytlích, které umísťujeme do polystyrenových krabic pro udržení teploty.

2.3.1. Příjem a karanténa ryb

Po doručení/získání ryb je nutné provést preventivní opatření, která zamezí přenosu patogenů mezi jednotlivými chovnými systémy. V případě nevykulených embryí je možné aplikovat ošetření hypochloridem sodným (150 ml vody a 0,1 ml 5% roztoku hypochloridu sodného po dobu 5 minut s následným propláchnutím jiker vodou), které lze považovat za velmi účinnou dezinfekci povrchu embryí. V případě již vykulených a starších ryb je možné volit pouze karanténu a bedlivé pozorování zdravotního stavu ryb. Z logického hlediska

je kontraproduktivní využívat profylaxe ryb v karanténě prostřednictvím volně dostupných širokospektrálních léčiv pro akvarijní ryby, jelikož by mohlo dojít k zamaskování případné patogenní nálože, která by za normálních podmínek prostřední propukla v nemocnost ryb.

Za ideálních podmínek by nikdy nemělo docházet k introdukci ryb do chovného systému, ve kterém se nenarodily. Tudíž by měl proběhnout jejich odchov a rozmnožení potomstva mimo hlavní chovný systém, což může být problematické z hlediska separace prostorů a možnosti zajistit komplexní péči o ryby. Z tohoto důvodu se obecně přistupuje k mírnějšímu opatření, které spočívá v tom, že raná stadia lze po karanténě začlenit do hlavního chovného systému, nicméně dospělé ryby z „venkovních“ zdrojů jsou vždy drženy mimo systém, následně rozmnoženy, jejich nevykulené potomstvo je dezinfikováno hypochloridem sodným dle postupu uvedeném v předchozím odstavci a následně může být začleněno do hlavního chovného systému.



Obr. 3. *Identifikace vhodných (A, B) a nevhodných stadií (D, E) vývoje dánia pro transport. A) Embryo ve stadiu 10 somitů s dobře odlišitelnou hlavou (hvězdička) a ocasní částí (šipka). Embrya 30 h od oplození, charakteristickým znakem je nenarovnaný trup, kdy je hlava stále v kontaktu se žloutkovým váčkem (C). D) Embryo ve stadiu pozdní gastruly je velmi citlivé na manipulaci, jelikož spodní část žloutku (označeno hvězdičkou) stále není obklopena zárodečnými vrstvami. E, F) Embryo 52 h po oplození, kdy již dochází ke kulení prvních jedinců. Charakteristickým znakem tohoto stadia je již rovná hřbetní linie. F) Doporučený způsob pro transport embryí ve zcela naplněné 50ml zkumavce. Pozn. Embrya na snímcích A, C a D byla enzymaticky dechorionována pro lepší zřetelnost daného stadia vývoje (Foto: R. Franěk).*

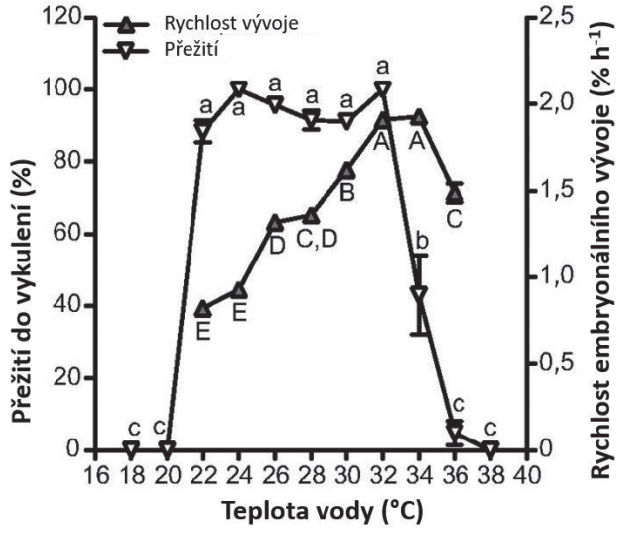
2.4. Chovné prostřední

Obecně lze dánia chovat v běžných akváriích, která mají individuální nebo společných oběh a filtraci vody včetně regulace teploty a osvětlení. Tento způsob je finančně nenákladný, na druhé straně je ale náročný na obsluhu (především čistění nádrží), ale i na prostor. V případě individuálních odchovných akvárií je mnohem vyšší náročnost na kontrolu kvality vodního prostředí (například nutná individuální kontrola pH nebo teploty v každém akváriu zvlášť). Tato náročnost na zajištění běžného chodu je ale na druhé straně vykoupena relativně vyšší bezpečností z hlediska šíření nákaz (pokud jsou akvária a nástroje přicházející do styku s vodou a rybami striktně odděleny od jiných).

Opakem chovu v běžných akváriích jsou komerčně dostupné recirkulační systémy ve formě regálů a polic, do kterých se vkládají jednotlivá akvária. Akvária jsou v přední části vybavena přítokem čerstvé vody shora, v zadní části se obvykle nachází sifon, který odebírá vodu ode dna a je oddělen od ryb vložkami různé světlosti, které umožňují odchovávat i ty nejmenší stadia. Tyto systémy jsou vybaveny centrálním řízením teploty, vodivosti, pH a fotoperiody. Dále jsou obvykle vybaveny účinnou dvoustupňovou filtrací vody (sítový bubnový filtr a biologický filtr) a dezinfekcí vody pomocí UV výbojek. Jasnou výhodou komerčně dostupných systému je jejich kapacita (vzhledem k efektivní mechanické a biologické filtraci lze držet hustější obsádky) a nízké časové nároky na údržbu jednotlivých akvárií, což je na druhé straně vykoupeno vysokou pořizovací cenou, kdy systém s kapacitou pro 2 000–3 000 dospělých ryb (v závislosti na hustotě nasazení) se cenově pohybuje v řádech statisíců korun.

2.4.1. Teplota

Ačkoliv je biologický rozsah teplot dánia velmi široký, tak pro laboratorní podmínky je doporučováno teplotní rozmezí 24–29 °C, kdy bývá obvykle referována teplota 28,5 °C, která byla použita pro tvorbu standardizovaných tabulek embryonálního vývoje. Rozdíl rychlosti vývoje v 28,5 °C oproti 22 °C je přibližně dvounásobný, nicméně přežití není ovlivněno (Obr. 4). Tato vysoká přizpůsobivost dává široké pole možností manipulovat s rychlostí vývoje dle experimentálních, ale i chovatelských požadavků (dosažení vhodného stadia pro přepravu embryí umožňující jejich následnou dezinfekci). Při volbě teploty pro jakékoliv životní stadium dánia je nutné mít na paměti, že teplota vody značně ovlivňuje rychlost embryonálního vývoje, množství rozpuštěného kyslíku, rychlost rozkladných procesů, ale často i rychlost vývoje nežádoucích patogenů. Zároveň je nutné mít na paměti, že v případě extrémně vysokých teplot v průběhu odchovu raných stadií může docházet k maskulinizaci ryb, a tudíž zvýšenému podílu samců, nicméně citlivost k těmto změnám se může v rámci jednotlivých linií/rodin lišit (Ribas a kol., 2017).



Obr. 4. *Závislost rychlosti embryonálního vývoje a přežití na teplotě vody. Odlišná písmena značí statisticky významný rozdíl (P < 0,001). (Převzato a upraveno podle Schnurr a kol., 2014).*

2.4.2. Fotoperioda

Dalším důležitým faktorem pro úspěšný chov a rozmnožování dánia je pravidelnost fotoperiody, jelikož je výtěr ryb obvykle indukován začátkem fotoperiody. Pro laboratorní podmínky používáme světlostní fázi v rozmezí 12–14 hodin a temnostní fázi 10–12 hodin. Zároveň je vhodné zajistit postupný nástup a ukončení periody. K rozsvícení a zhasnutí světel by nemělo docházet náhle, ale postupně prostřednictvím svítačů/stmívačů, aby nedocházelo ke stresování ryb. V odchovné místnosti je také vhodné zamezit prostupu denního světla okny (například nalepením hliníkové fólie) a vhodně zmírnit světelné záření z různých kontrolních panelů dalších přístrojů, které by mohly rušit ryby v době temnostní fáze.

2.4.3. Kvalita vody

Zde platí obecná doporučení platná pro většinu ryb, kdy by mělo být minimalizováno množství volného chlóru, dusitanů, dusičnanů a amoniaku. Kvalita vody z vodovodního řádu může být velmi proměnlivá (zvýšené množství dezinfikantu), proto je nutné používat vodu dostatečně odstátou a provzdušňovanou. V případě chovných systému je voda obvykle ošetřena

uhlíkovými předfiltry a následně prochází reverzní osmózou. pH vody je vhodné udržovat na hodnotě 7, kdy je nutné předpokládat trvalou tendenci k poklesu v důsledku probíhající nitrifikace v biologických filtrech. pH vody je nutné upravovat hydrogenuhličitanem sodným (zajistí rychlou úpravu pH a je možné ho dávkovat rovnou do systému), případně mletým vápencem (pomalejší uvolňování, vhodnější spíše pro stabilizaci a jako pojistka při výpadku úpravy pH pomocí hydrogenuhličitanu), který lze naplnit do propustných obalů a umístit přímo do nádrže se zásobní vodou.

2.4.4. Hustota obsádek

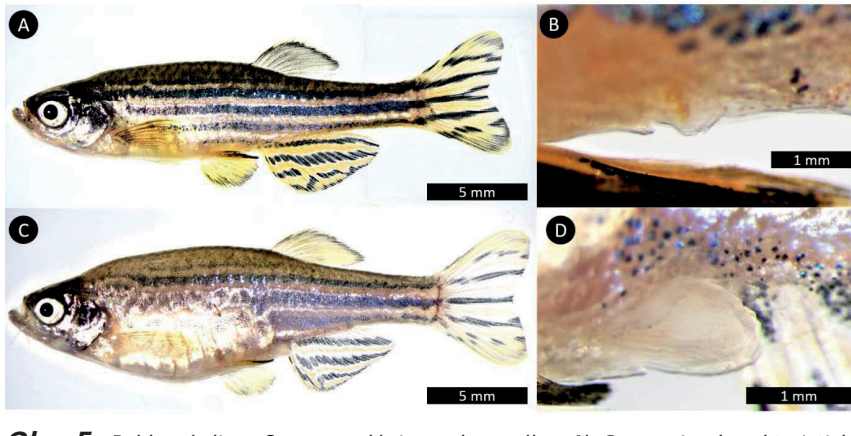
Pro dospělé jedince počítáme do 5–10 ks ryb na litr vody. Pro embrya do týdne věku počítáme ne více než 100 ks na 25 ml vody. Rozplavané larvy držíme až do počátku přijímání artemie – žábronožky solné (*Artemia salina*) v maximální hustotě 300 ks na 1 l vody. Při předkládání artemie snižujeme hustotu obsádky na 50–100 jedinců na litr. Obecně je třeba chápat tyto údaje jako orientační, jelikož budou mimo jiné ovlivněny teplotou vody a intenzitou krmení. Dánio je hejnový druh, tudíž není vhodné ryby držet odděleně, pokud to není z hlediska experimentu nutné. Obohacení chovného prostředí (např. úkryty, substrát na dně nebo rostliny) není nutné, naopak by to znamenalo komplikaci z hlediska udržení zoohygieny v důsledku zvýšení plochy, kterou mohou osídlit patogeny.

2.4.5. Zoohygiena

V případě chovu v separátních akváriích je vhodné striktně oddělovat jednotlivé nástroje a nádoby, se kterými přichází ryby/voda z akvária do kontaktu od ostatních akvárií. U chovných systémů je společný oběh vody všemi akvárii, což klade zvýšené nároky na zoohygienu a kontrolu zdravotního stavu. V rámci prevence je možné udržovat vyšší salinitu (0,1 %) (Westerfield, 2007). Stejně tak je vhodné využívat lázeň 10% roztoku chloridu sodného pro manipulační síťky a další náčiní, které není možné mezi použitím kompletně vysušit. Jedince s netypickým chováním (apatie, nezájem o potravu, polehávání na dně) odstraňujeme ze systému. Stejně tak odstraňujeme jedince, u kterých pozorujeme obecné známky špatného stavu, které mohou ukazovat na onemocnění, možnými abnormalitami jsou exoftalmus a endoftalmus, zježené nebo vypadané šupiny, atypické změny na těle. V rámci chovů čítajících vyšší jednotky stovek či tisíce kusů lze považovat za normální občasný výskyt individuálních jedinců s výše zmíněnými symptomy. Důležité je sledovat případný trend výskytu, kdy v rámci jednotlivců v průběhu měsíce není ve většině případů nutný jakýkoliv léčebný zásah. V případě výskytu výše zmíněných symptomů u většího počtu ryb je nutné další postupy konzultovat s veterinárním lékařem, který na základě odborné diagnózy určí léčebný postup.

2.5. Rozmnožování v laboratoři

Právě malá náročnost na podmínky podmiňující rozmnožování dánia je jedním ze základních kamenů rozšířenosti tohoto druhu v laboratoři. Dánio pruhované dosahuje ve standardních laboratorních podmínkách dospělosti kolem třetího měsíce věku, kdy lze předpokládat, že samice z dané kohorty dospívají mírně později než samci. Nicméně experimentálně bylo prokázáno, že lze dosáhnout pohlavní dospělosti již před 50. dnem věku za předpokladu intenzivního rozkrmu živou potravou spojeného s konstantní fotoperiodou (Dabrowski a Miller, 2018; Delomas a Dabrowski, 2019). Pohlavní dospělost je spojena s jasným pohlavním dimorfizmem, kdy samci mají štíhlý a téměř rovný profil těla (Obr. 5A). Další charakteristikou je nápadnější vybarvení pruhů, ale také ocasní ploutve. Nicméně je nutné zmínit, že intenzita vybarvení je v čase značně proměnlivá, kdy například při stresu dochází k celkovému vyblednutí ryby. Samice, zvláště pak v reprodukční kondici, jsou charakteristické zvětšenou břišní partií, kdy je tento znak patrný při pohledu z boku (Obr. 5C) i ze shora. Při bližším pohledu je možné pozorovat u močopohlavní papily malé kladélko, které (Obr. 5D) vystupuje 1–2 mm a je patrné především u samic těsně před výtěrem. U samců tvoří močopohlavní papila okem neznatelný výběžek (Obr. 5B).

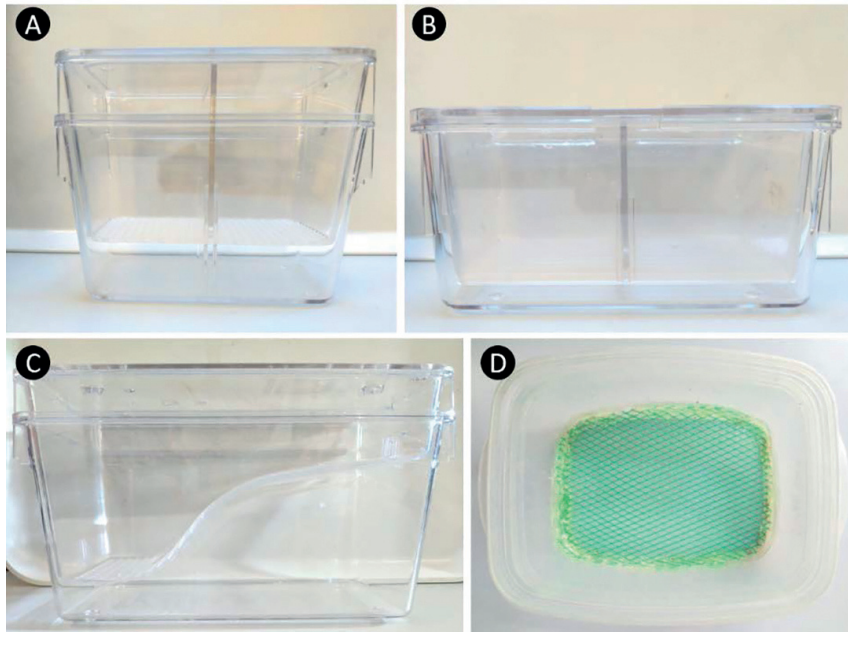


Obr. 5. *Pohlavní dimorfizmus u dánia pruhovaného. A) Samec je charakteristický rovnou spodní linií těla a pouze mírně klenutou horní linií těla. Zbarvení těla a ploutví je velmi syté. B) Detail močopohlavní papily. C) Samice má typicky zvětšenou břišní dutinu a více klenutý hřbet. Zbarvení těla je oproti samci bledé. D) Detail na „kladélko" samice značící její připravenost k výtěru (Foto: R. Franěk).*

Samotná problematika poměru pohlaví, respektive determinace pohlaví, je v případě dánia více než komplikovaná. Je vysoce pravděpodobné, že v rámci běžného chovu několika různých linií dánia v laboratoři dochází k velmi nevyrovnanému výskytu poměru samců a samic (Ribas a kol., 2017). Jedním z hlavních důvodů je historie introdukce dánia do laboratoří, kdy většina současných linií byla založena z AB linie, kterou vyprodukoval George Streisinger s cílem identifikovat a stabilizovat její genotyp, aby byla co nejvíce prostá recesivních letálních mutací (Streisinger a kol., 1981). Je více než pravděpodobné, že právě odstranění recesivních letálních mutací z genofondu bylo ruku v ruce se zásadními posuny i v jiných lokusech, včetně těch, které se podílejí na genetickém určení pohlaví. Potvrzeným následkem je například kompletní ztráta pohlaví determinujících lokusů u dvou laboratorních linií (AB a TU) (Wilson a kol., 2014). Obecný konsenzem je, že dánio má WZ/ZZ systém determinace pohlaví, kdy samci jsou heterogametní a samice homogametní. Teoreticky, aplikace uniparentální dědičnosti by měla v případě gynogeneze produkovat poměr pohlaví 1 : 1 a pouze celosamčí potomstvo v případě androgeneze, čehož ale v praxi není dosahováno. Tyto zjištění byly již v 80. letech jasným znakem, že v případě dánia a určení pohlaví budou významnou roli hrát environmentální faktory (Brown a kol., 2012; Liew a kol., 2012; Liew a Orbán, 2014; Kossack a Draper, 2019).

2.5.1. Poloumělý výtěr

Jako poloumělý výtěr označujeme u dánia metodu, kdy gamety ryb nejsou získávány přímým zásahem člověka. Ryby jsou přesunuty do vytíracích nádob, kde díky stimulujícímu prostředí (nízká hladina vody a profilované dno) dochází k samovolnému rozmnožování ryb. Vytírací nádoba se obvykle skládá z větší nádoby s nepropustným dnem a menší nádoby, která je do ní vložena a má různě členité a perforované dno. Právě perforace dna je naprosto zásadní, jelikož vytřené jikry propadnou do spodní části vytírací nádoby a jsou chráněné před konzumací (dánio nemá rodičovskou péči). Další výhodou těchto nádob je možnost oddělení pohlaví před výtěrem. Díky oddělení ryb lze následně poměrně přesně plánovat výtěr jiker. V případě nasazení obou pohlaví bez oddělení nezřídka dochází k výtěru ryb i pouze několik hodin po nasazení. V současné době jsou komerčně dostupné různé typy boxů, nicméně základní vkládací část lze vyrobit i svépomocí nalepením plastové mřížky s průměrem ok dostatečným pro propadnutí kladených jiker (Obr. 6). Průhledný materiál nádob na vytírání umožňuje kontrolu výtěru bez manipulace a rušení ryb. Níže popsaný způsob poloumělého výtěru nezpůsobuje rybám výraznější stres, tudíž je teoreticky možné vytírat ryby v podstatě denně.

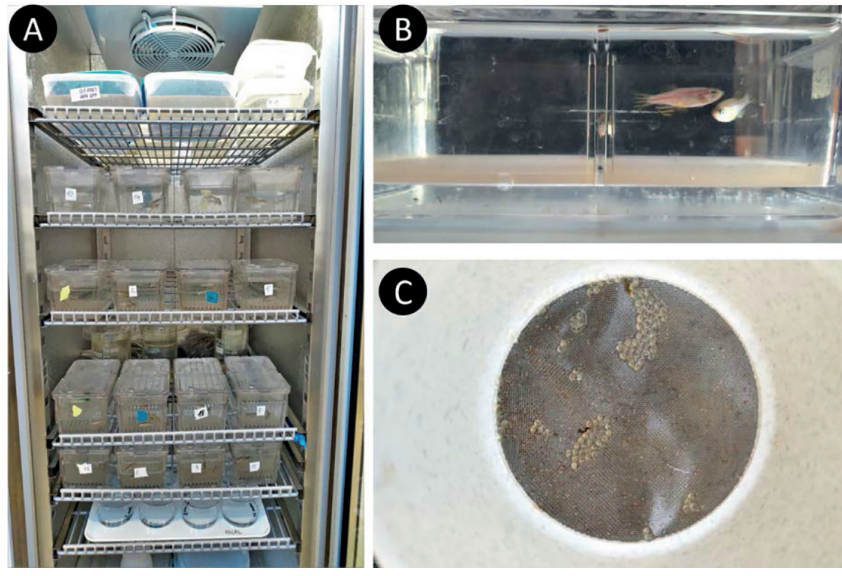


Obr. 6. *Různé typy vytíracích nádob vhodné pro dánio pruhované. A–C) Komerčně dostupná vytírací akvária skládající se vždy z vnitřní části perforovaným dnem, která se vkládá do vnějšího akvária s pevným dnem. Akvária jsou vybavená víkem a přepážkou umožňující oddělit samce od samic. Objemy akvárií jsou 0,7 l (A), 1 l (B) a 1,7 l (C). D) Vytírací vložka vyrobená z plastové krabičky s odstraněným dnem a přilepeným hustým plastovým pletivem o velikosti ok přibližně 6 mm (pro přilepení je nutné použít akvaristický silikon). Do vytíracích nádob A, B a D je vhodné umísťovat maximálně 3–4 kusy dospělých ryb. Do nádoby na obrázku C maximálně 6–8 kusů dospělých ryb (Foto: R. Franěk).*

Poloumělý výtěr provádíme následujícím postupem:

1. Ryby nejsou krmeny min. 18 h před plánovaným výtěrem. V případě plného zažívacího traktu v době nasazení do vytíracích nádob dochází po výtěru ke kontaktu jiker a výkalů, což zvyšuje riziko kontaminace jiker patogeny a klade vyšší nároky na jejich dezinfekci a zdárný odchov do stadia vykulení.
2. Nasazení probíhá min. 4–6 hodin po posledním krmení, tzn. odpoledne před experimentem.
3. Ryby jsou nasazovány do vytíracích nádob plněnou vodou z chovného systému.

4. Je vhodné dodržet fotoperiodu, na kterou jsou dané ryby zvyklé. Je důležité zajistit, aby ryby nebyly rušeny světlem především v době temnostní části fotoperiody.
5. Vytírací nádoby jsou umístěné do temperovaného inkubátoru (Obr. 7A) (pozn. záleží na teplotě v chovném systému, kdy v případě nižší odchovné teploty 25–26 °C je možné umístit nádoby pouze v dostatečně temperované místnosti).
6. Dle požadavků experimentu je po začátku světelné fáze fotoperiody odstraněna bariéra oddělující pohlaví. První nakladené jikry lze pozorovat v podstatě ihned po expozici samic samcům (Obr. 7B). Samice klade jikry několikrát po sobě v menších porcích (obvykle desítky kusů), které jsou ihned oplozeny samcem. Dle zkušenosti autorů (data ze 100 párových poloumělých výtěrů) samice průměrně produkuje přibližně 270 jiker.
7. V případě již dostatečného počtu vytřených ryb jsou jikry odebrány následujícím postupem:
   a. Odstranění vkládací vložky s rodiči.
   b. Nasátí vytřených jiker Pasteurovo pipetou, případně je možné celý obsah nádoby včetně jiker přelít přes husté síto (Obr. 7C).
   c. Následně je možné rodiče vrátit zpět do vytírací nádoby, kdy je velká pravděpodobnost, že budou ve výtěru pokračovat (pokud nedošlo k nakladení všech ovulovaných jiker).
8. Prvotní ošetření jiker pomocí propláchnutí odstátou vodovodní vodou, případně dezinfekce povrchu roztokem chlornanu sodného (obvykle hlavní složka domácích dezinfekčních přípravků a bělidel), kdy jsou následně jikry propláchnuty odstátou vodovodní vodou. Ošetření chlornanem sodným není naprosto zásadní, nicméně k němu přistupujeme především v případě získaní velkého množství jiker pro následný odchov, kdy by bylo časově velmi náročné odstraňovat neoplozené jikry jednotlivě. Chlornanem sodným dezinfikujeme následujícím způsobem:
   a. Uvažujeme použití běžně dostupného domácího bělidla o 5–6% obsahu chlornanu sodného.
   b. Na přípravu 100 ml dezinfekčního roztoku počítáme 100 ml vody a 50 µl 5% chlornanu sodného.
   c. Převedeme ošetřovaná embrya do malého sítka, které na 5 minut zcela ponoříme do dezinfekčního roztoku.
   d. Po ukončení expozice minimálně 3x promyjeme jikry vodou. Alternativně lze pro neutralizaci chlornanu použít čerstvě připravený 0,05% roztok thiosíranu sodného ve vodě, kterým embrya rychle propláchneme a následně 2x promyjeme vodou.



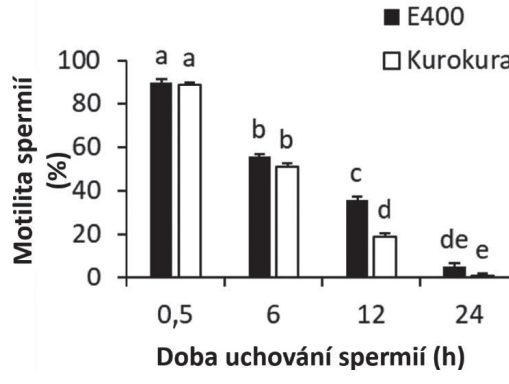
Obr. 7. *Poloumělý výtěr dánia pruhovaného ve vytíracích nádobách. A) Umístění vytíracích nádob do temperovaného inkubátoru. B) Brzy po odstranění bariéry je možné pod vytíracím roštem nádoby pozorovat první vytřené jikry. C) Pohled na sebrané jikry pomocí hustého síta (Foto: R. Franěk).*

2.5.2. Umělý výtěr

Umělý výtěr provádíme způsobem, který je až do výše zmíněného bodu č. 6. identický. Důvodem nasazování ryb do vytíracích nádob i pro umělý výtěr je skutečnost, že umožňuje účinně identifikovat ovulující samice, tzn. že v podstatě nedochází ke zbytečné manipulaci se samicemi, které nejsou v daný okamžik vhodné k výtěru (pozn. v porovnání s poloumělým výtěrem dochází k vyšší míře stresu u ryb). Po použití samců k umělému výtěru doporučujeme min. 2 týdny do dalšího výtěru s ohledem na potřebnou délku spermatogeneze (7) (Leal a kol., 2009), ale i rekonvalescenci po manipulaci. V případě samic představuje umělý výtěr zásadnější zásah, kdy je nutné období na rekonvalescenci minimálně 1 měsíc, mimo jiné i s ohledem na skutečnost potřebného vývoje a růstu oocytů.

Pro manipulaci a uchování odebraného spermatu používáme imobilizační roztoky, kdy doporučujeme roztoky E400 (Matthews a kol., 2018) nebo Kurokura 180 (Rodina a kol., 2004). Pro krátkodobé uchování spermií v rámci provedení *in vitro* oplození jsou oba imobilizační roztoky rovnocenné.

S potřebou narůstajícího času uchování je ale vhodné volit roztok E400, ve kterém si spermie uchovávají vyšší motilitu (Obr. 8), ale především vyšší oplozovací schopnost (Cheng a kol., 2021). Imobilizační roztok lze připravit ve větším objemu, rozdělit do menších zkumavek a uchovávat v mrazicím boxu s možností opakovaného zmrazování a rozmrazování.



Obr. 8. *Vliv dvou imobilizačních roztoků a doby uchování na motilitu spermií dánia pruhovaného. (Převzato a upraveno podle Cheng a kol., 2021).*

Kurokura 180
- 180 mM NaCl
- 2,68 mM KCl
- 1,36 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 2,38 mM $NaHCO_3$

E400
- 130 mM KCL
- 50 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$
- 1 mM $MgSO_4$
- 10 mM D-(+)-Glucose,
- 30 mM HEPES-KOH (pH 7,9)

1. Po odstranění oddělující bariéry je nutné ryby bedlivě pozorovat (např. každých 5 minut), kdy je zásadní včas pozorovat první uvolněné jikry. To je známkou ovulace samice a její vhodnosti k umělému výtěru. V případě pozorování vytřených jiker je nutné neprodleně pohlaví opět oddělit, aby nedocházelo k dalšímu uvolňování jiker do vodního prostředí.
2. Po získání dostatečného počtu ovulujících samic se přistupuje k vlastnímu výtěru. Povaha samčích pohlavních buněk ryb umožňuje jejich krátkodobé

uchování bez ztráty kvality minimálně po dobu jednotek hodin. Naopak, jikry dánia jsou poměrně citlivé na přezrávání, kdy zvláště v případě malého množství jiker je jejich dlouhodobější uchování velmi problematické (Waghmare a kol., 2021).

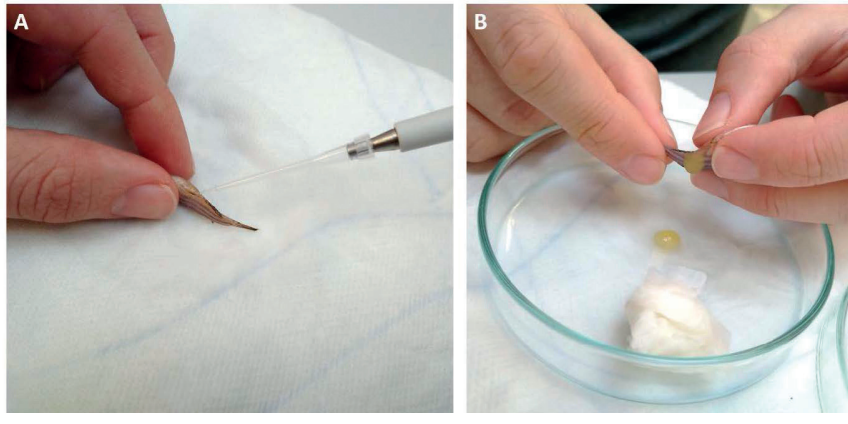
Výtěr samců je prováděn následovně:

a. Anesteze jedince v 0,05% roztoku MS222.
b. Přesunutí na navlhčenou podložku.
c. Jemné osušení břišní partie s následným opláchnutím imobilizačním roztokem (100–200 µl).
d. Sperma je získáváno jemným tlakem palce a ukazováku v okolí břišních ploutví (Obr. 9A), kdy sperma je neprodleně nasáto mikropipetou (pipeta s objemem 1–10 µl) a ihned umístěno do imobilizačního roztoku (obvykle počítáme 20 µl imobilizační roztoku, což nám zajistí minimálně 10x naředění odebraného spermatu) a uchováváno na ledu.

Výtěr samic je prováděn tímto způsobem:

a. Anesteze jedince v 0,05% roztoku MS222.
b. Přesunutí na navlhčenou podložku.
c. Jemné osušení břišní a ocasní partie.
d. Uchopení samice za hlavou mezi palcem a ukazovákem, kdy palec a ukazovák druhé ruky slouží k vyvíjení mírného tlaku na břišní dutinu, kdy dochází k vytlačení jiker (Obr. 9B). Obecně je vhodné mít rybu v šikmé pozici hlavou nahoru a břichem směrem k podložce, díky tomu vytřené jikry směřují do nádoby (obvykle Petriho miska) gravitací, v případě přítomnosti jiker na povrchu těla samice je možné je přesunout pomocí plastové špičky pro mikropipetu.
e. Vytřené jikry je nutné neprodleně chránit před světlem a zabránit jejich vysychání (např. vložením navlhčené papírové utěrky). Takto lze jikry uchovat maximálně po několik desítek minut. Zároveň je však nutné mít na paměti, že jikry před samotným oplozením nesmí přijít do styku s vodou, jelikož by došlo k jejich předčasné aktivaci a staly by se neschopné oplození.

   Pozn. V případě dánia existují komerčně dostupné roztoky pro uchování jiker, případně roztoky, které lze připravit v laboratoři (např. podle Endoh a kol., 2018). V případě použití roztoků je nutné mít na paměti, že takovýto roztok je nutné před oplozením co nejvíce odstranit, jelikož díky své vyšší osmolalitě brání aktivaci gamet, nicméně kompletní odstranění není vzhledem k povaze jiker možné. Následkem toho vzrůstá potřeba spermatu, respektive potřeba vody pro aktivaci, jejíž vyšší množství je nutné kompenzovat přidáním většího objemu spermatu.



Obr. 9. *Získávání gamet. A) Odběr spermií mikropipetou. B) Výtěr jiker na Petriho misku (Foto: R. Franěk).*

Aktivace gamet a oplození:

a) Po získání gamet se přistupuje k vlastnímu oplození. Na vytřené jikry je nanesené sperma, které lze s jikrami pomocí špičky mikropipety velmi jemně promíchat. Samci produkují sperma o koncentraci 0,08–3,52 x 106.μl^{-1} a objemu od jednotek desetin mikrolitru až po 2 µl. Nejvyšších hodnot oplození (90 % a více) je dosahováno při koncentraci spermatu 6 x 106 na 100 µl objemu aktivačního roztoku (vody). Vyšší koncentrace nepřinášejí zvýšení oplozenosti. Naopak snížením koncentrace o řád je oplozenost přibližně poloviční oproti koncentraci 6 x 106. Snížením koncentrace na 6 x 105 lze dosáhnout oplozenosti pouze v jednotkách procent (Cheng a kol., 2021).
   Následně je přidána odstátá voda, kdy je nutné s Petriho miskou zatřást, aby došlo k oddělení jednotlivých jiker. Po přibližně 30 s (odpovídá době motility spermií) krouživých pohybů je postupně přidáváno větší množství vody.
   V případě potřeby oplozování menšího množství jiker (desítky) a nedostatku koncentrovaného spermatu je možné jikry nanést do zkumavek s plochým dnem (např. kryotuby), kde je následně naneseno sperma a ihned aktivováno násobně menším objemem vody (pro aktivaci 50 ks jiker je potřeba přibližně 100 µl vody), než je tomu při oplození na Petriho misce. Po 30 sekundách mírného protřepávání lze jikry převést na Petriho misku.
b) Přibližně po 5–10 minutách od aktivace dochází k plnému nabobtnání chorionu a jikry je vhodné propláchnout vodou, aby došlo k eliminaci

jejich mírné lepivosti, která je z části způsobená jikrným povrchem, ale i přítomností spermií.

Výsledkem obou zmíněných postupů pro výtěr ryb je získání oplozených jiker. Kdy v závislosti na velikosti samice lze získat v řádu jednotek stovek jiker, kdy možné maximum u největších samic se může blížit až k tisíci kusů jiker.

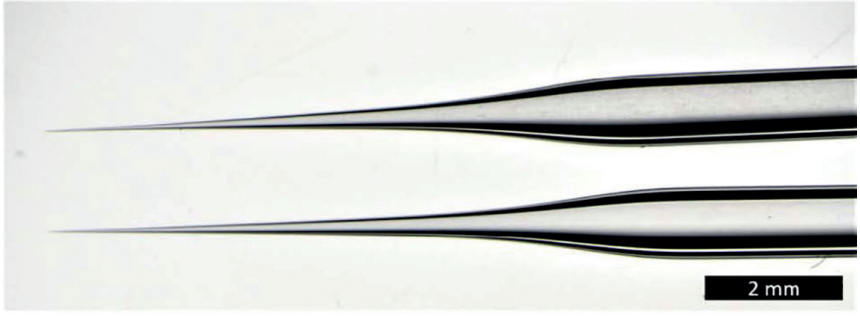
2.6. Manipulace s embryi a jejich mikroinjikace

Jednou ze základních charakteristik jiker dánia je jejich transparentnost a možnost účinného a snadného vnesení materiálu do jikry či embrya. V současné době je mikroinjikace jiker/embryí zásadním nástrojem molekulární biologie. Mikroinjikace se v současné době těší přednímu zájmu především díky poměrně recentním technologiím editace genomu pomocí nástrojů CRISPR/Cas9 a Zinc-finger nukleázy a tvorbě transgenních organizmů s expresí reportérových proteinů (např Tol2). Ale i dočasného tlumení translace proteinů pomocí injikace morpholin. Nelze opomenout ani přechodnou vizualizaci exprese genů *in vivo* pomocí injikace uměle syntetizované mRNA. Nutné je zmínit i možnost intra cytoplazmatické injekce spermie do oocytu (tzv. ICSI), injikace jádra buňky do oocytu neboli jaderný transfer (klonování). Tudíž je možné s jistotou tvrdit, že zvládnutí mikromapulačních a mikroinjikačních technik je naprosto zásadní a nalézá široké možnosti uplatnění. Níže zmíněný postup popisuje dlouholeté zkušenosti s mikromapulací a mikroinjikací rybích oocytů, kdy v naší laboratoři používáme tyto nástroje především pro editaci genomu, dočasné tlumení exprese genů, ale i značení buněčných populací. Samotný postup mikroinjikace je pro zmíněné metody v podstatě identický jen s rozdílem injikované látky. Pro účely zjednodušení popisujeme mikroinjikaci na použití nespecifického fluorescenčního barviva, které barví veškeré buňky embrya.

Vstupním materiálem pro mikroinjikace jsou oplozené jikry dánia. V případě dánia obecně doporučujeme začít mikroinjikaci co nejdříve po získání jiker. Důvod je časově limitovaná distribuce do buněk embrya pomocí žloutkových proudů, kdy po dosažení stadia 32 buněk již nedochází k rovnoměrné distribuci injikované látky z důvodu vytvoření dvou vrstev blastomer.

2.6.1. Příprava před získáním jiker

1. Namíchání 0,2 a 2M roztoku KCl, který slouží pro vyrovnání osmolality mikroinjikované látky s cytoplazmou vajíčka.
2. Příprava mikroinjikované látky:
   a. Pro účely mikroinjikace nespecifických fluorescenčních barviv je možné například použít Fluorescein-5-isothiokyanát-dextran nebo Rhodamine-Bthiokyanát – Dextran, doporučujeme injikovat tato nespecifická barviva v koncentraci 1–2,5 %. Tato koncentrace je dostatečná pro vizuální identifikace správně injikovaných jiker ihned po manipulaci, zároveň umožňuje i pozdější kontrolu injikovaných embryí pomocí detekce fluorescenčního signálu.
   b. Připravený roztok následně ředíme 9 : 1 s roztokem 2M KCl.
3. Vytažení skleněných kapilár:
   a. Na trhu je nepřeberné množství výrobců skleněných kapilár, kdy zásadní je řídit se vnějším průměrem z důvodu kompatibility s mikroinjektorem a mikromanipulátorem. Obecně doporučujeme kapiláry tenkostěnné, které i při minimálním otevření umožňují dostatečný tok injikované látky. Přítomnost mikrofilamentu není nutná.
   b. Kapiláry připravujeme v tzv. pulleru – zařízení vybavené zahřívající cívkou, s možností kontroly teploty a zároveň uchycení kapiláry. Vzhledem k širokému spektru kapilár nelze uvádět univerzální nastavení pulleru. Zásadní je, vzhledem k velikosti embryí dánia, aby rozměry špičky kapiláry byly co nejmenší (Obr. 10).
   c. Po vytažení kapilár doporučujme otevřený konec po dobu 2–3 s zahřát nad laboratorním kahanem, aby došlo k zarovnání nerovných okrajů a bylo možné kapiláru snadno zasunout a upevnit do mikroinjektoru.



Obr. 10. *Doporučený tvar mikrokapilár pro injikaci embryí dánia pruhovaného. Při vytahování skleněných kapilár je důležité optimalizovat nastavení (teplota a množství závaží) tak, aby bylo dosaženo co nejmenšího průměru špičky. Pro injikace nedechorionovaných jiker je zároveň zásadní, aby první 1–2 mm kapiláry měly co nejmenší průměr, aby nedocházelo k roztržení chorionu (Foto: R. Franěk).*

4. Příprava Petriho misek potažených agarem:
   a. 1 g agaru rozmíchat v 99 ml vodovodní vody (případně 99 ml Hepes Ringerova roztoku, pokud jsou injikována dechorionovaná embrya).
   b. Přivedení roztoku k varu (za použití laboratorního vařiče nebo mikrovlnné trouby) s následným udržováním teploty, dokud není agar plně rozpuštěný a roztok je transparentní (zůstane lehce nažloutlý).
   c. Nanesení cca 10 ml roztoku na Petriho misku (vytvoření vrstvy silné přibližně 5 mm). Takto připravené misky nechat vychladnout a lze uchovávat v lednici po dobu 2–3 týdnů.

2.6.2. Odstranění chorionu

Chorion je obálka vlastního embrya, která ho chrání před poškozením až do okamžiku vykulení. Pro účely mikroinjikace lze zvážit jeho odstranění pomocí enzymů. Před samotným popisem postupu je ale nutné mít na paměti negativní vliv samotného procesu odstranění chorionu včetně zvýšené citlivosti embryí po období následujících 24 hodin, což klade zvýšené nároky na péči. Mikroinjikace embryí s chorionem je samozřejmě možná, avšak je pomalejší – obvykle 200–300 embryí za hodinu, oproti ~1 000 dechorionovaných embryí. Enzymatického odstranění chorionu zahrnuje:

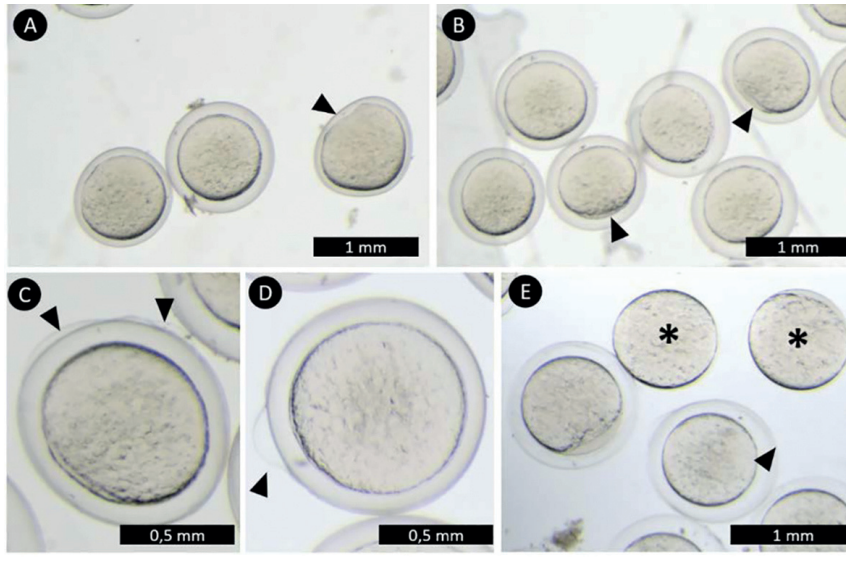
1. Přípravu roztoků pro dechorionování a následnou kultivaci embryí
   a. Ringerův roztok pro dechorionaci (Taps Ringer):
      - 0,1 g trypsinu a 0,4 g močoviny rozpustit v:
      - 100 ml Ringerova roztoku
        - 0,748 g NaCl
        - 0,02 G KCl
        - 0,026 g $CaCl_2$ $2H_2O$
        - 0,024g $C_7H_{17}NO_6S$ (TAPS)
        - Doplnit objem na 100 ml destilovanou vodou
        - Pomocí 1M NaOH upravit pH na 8,3.
   b. Ringerův roztok pro kultivaci embryí a neutralizaci trypsinu (Hepes Ringer):
      - 80 ml destilované vody
      - 1,6 ml vaječného bílku rozpustit do:
      - 100 ml Ringerova roztoku
        - 0,748 g NaCl
        - 0,02 g KCl
        - 0,026 g $CaCl_2$ $2H_2O$
        - 0,024g $C_8H_{18}N_2O_4S$ (HEPES)
        - Doplnit objem na 100 ml destilovanou vodou
        - Pomocí 1M NaOH upravit pH na 7,3.

Pozn. Oba Ringerovy roztoky (bez trypsinu či vaječného bílku) lze připravit 10x koncentrované, autoklávovat a uchovat v chladu (+4 °C) po dobu několika týdnů až měsíců. V případě úpravy pH 10x koncentrovaného roztoku je nutné použít 10M NaOH, aby nedocházelo k nadměrnému naředění. Na trhu je nepřeberné množství variant enzymu trypsinu o různých čistotách. Obecně platí, že levnější trypsin obsahuje i příměsi dalších proteáz, které zvyšují jeho účinek, výsledkem je vyšší enzymatická aktivita a rychlejší dechorionace, která může být nebezpečná pro embrya. Řešením může být snížení dávky trypsinu, případně použití chemicky čistějšího trypsinu (obvykle s označením pro použití v buněčné nebo molekulární biologii).

   c. Médium pro druhý a další den kultivace (druhé kultivační medium)
      - 1M $CaCl_2$ 180µL
      - 1M $MgCl_2$ 180µL
      - Destilovaná voda 100mL

Na dechorionování 200–300 embryí počítáme s potřebou 100–200 ml Taps Ringeru a dvojnásobným množstvím Hepes Ringeru. Získaná embrya umístíme do Petriho misky, odlijeme vodu a embrya jednou propláchneme Taps Ringerem. Petriho misku s embryi umístíme do temperovaného inkubátoru

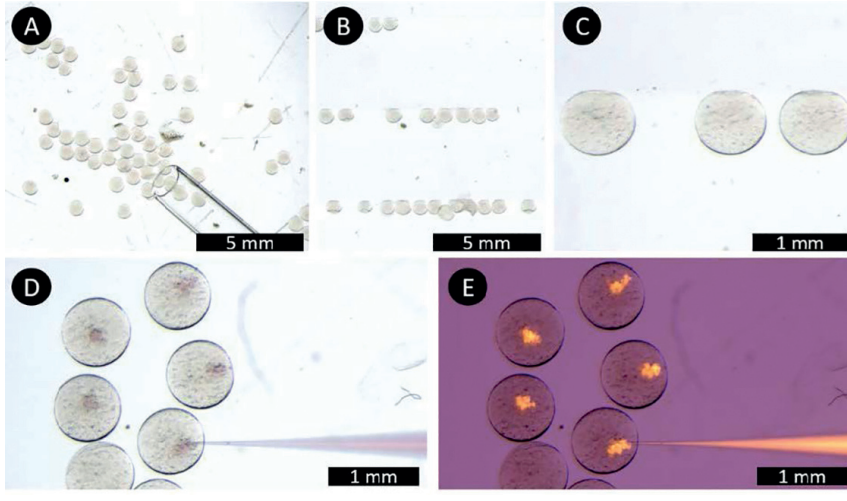
(vyšší teplota zvyšuje aktivitu trypsinu). Po 10–15 minutách je možné pozorovat narušení chorionu u několika embryí (Obr. 11), krouživými pohyby si ověříme, zdali je část embryí plně uvolněná z chorionu. V případě uvolnění z obalů ihned přistupujeme k výměně roztoku za Hepes Ringer, kdy samotný pohyb embryí při výměně vody způsobí uvolnění z chorionů u většiny embryí. Následně provádíme další 2–3 výměny Hepes Ringeru, aby byla minimalizována koncentrace a aktivita trypsinu. Při promývání dbáme maximální šetrnosti a nevystavujeme dechorionovaná embrya přímému kontaktu se vzduchem. Je obvyklé, že několik kusů embryí zůstane nedechoriovaných. Dechorionovaná embrya jsou připravená k mikroinjikaci.



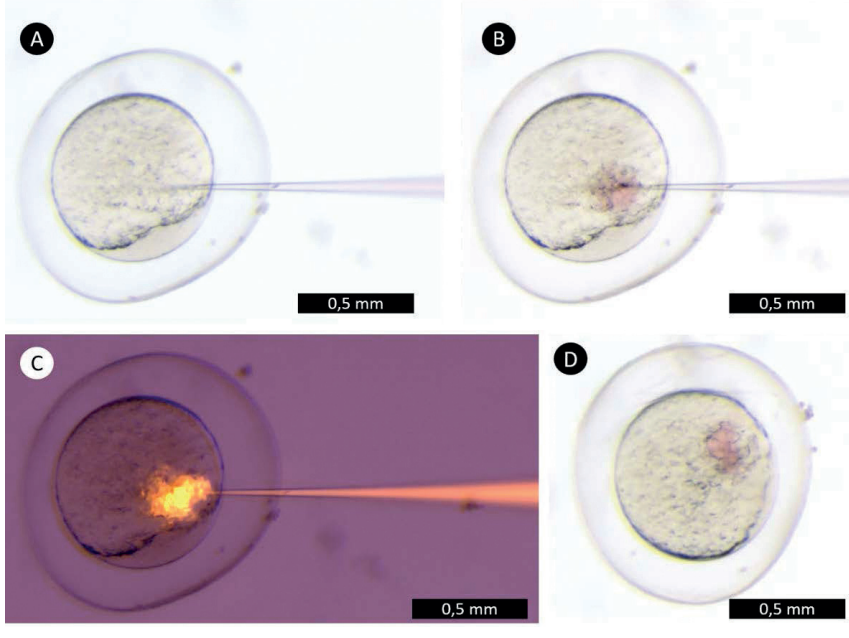
Obr. 11. *Odstranění chorionu. A) Embrya přibližně jednu minutu po oplození. Dochází k rychlé hydrataci, což má za následek obnovení koulovitého tvaru a oddělení chorionu od embrya. Černá šipka značí embryo v průběhu hydratace. B) Embrya 5 minut po oplození. Chorion je plně nabobtnalý a již dochází k separaci animálního pólu (označeno černou šipkou). C a D) Přibližně po třech minutách expozice v dechorionačním roztoku dochází k odchlípení vnější vrstvy chorionu od vnější (označeno černými šipkami). E) po dalších 5–10 minutách lze již pozorovat první embrya bez chorionu (označena hvězdičkou). V tento okamžik je vhodné embrya promýt neutralizačním Hepes Ringerovým roztokem (Foto: R. Franěk).*

2.6.3. Vlastní mikroinjikace

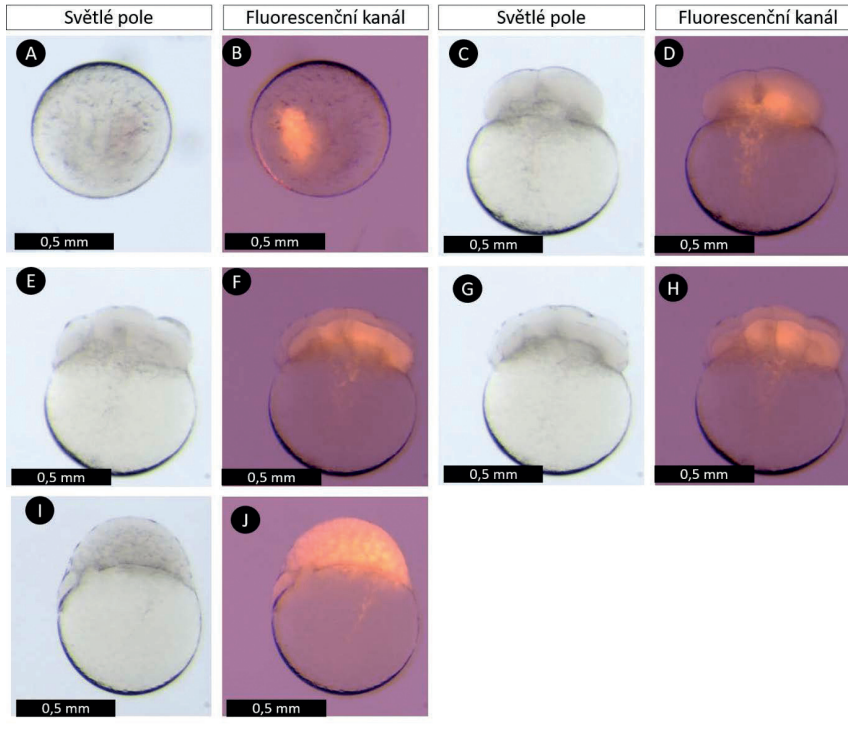
1. Vzhledem k rychlosti embryonálního vývoje doporučujeme mít v okamžiku dostupnosti jiker již kompletně připravené pracoviště a nástroje pro mikroinjikaci.
2. Embrya přemístíme pomocí skleněné pipety (Obr. 12A) na misku potaženou agarem. V případě injikace dechorionovaných embryí umísťujeme embrya do několika řad (případě jamek), což následně zefektivní samotný proces mikroinjikace (Obr. 12B–E). V případě mikroinjikace nedechorinovaných embryí shlukujeme embrya do středu Petriho misky.
3. Naplněnou a upnutou mikrokapiláru nastavíme do pracovní pozice ve vodě a pomocí jemné pinzety ulomíme špičku. Tento krok je naprosto zásadní, kdy je nutné otevřít mikrokapiláru na minimální možný průměr vzhledem k malé velikosti a citlivosti embryí dánia.
4. Nastavení toku z kapiláry závisí na použití mikroinjektoru – u manuálního nastavujeme tok kontinuální, u elektronicky kontrolovaného obvykle využíváme toku, který spouštíme a zastavujeme stisknutím pedálu. Objem mikroinjikované tekutiny lze stanovit pomocí vstříknutí tekutiny do oleje a následného změření průměru kapky, kdy kapka o průměru 0,1 mm představuje přibližný objem 5 nl.
5. Samotnou mikroinjikaci provádíme do žloutku embrya pod blastodisk (Obr. 13), kdy díky aktivnímu transportu žloutku je zajištěn přesun injikované tekutiny do animálního pólu (Obr. 14).
6. Správně mikroinjikovaná embrya jsou snadno detekovatelná přítomností skvrny uvnitř žloutku, zároveň nemají porušené membrány a nedochází k volnému vytékání žloutku, případně mikroinjikované tekutiny. Poškozená či špatně mikroinjikované embrya ihned odstraňujeme.
7. Po mikroinjikaci přesunujeme embrya do inkubátoru. Přibližně 2–3 hodiny po mikroinjikaci kontrolujeme jejich stav a případně odstraňujeme mrtvá či abnormálně se vyvíjející embrya. Pro zajištění maximálního přežití doporučujeme minimalizovat koncentraci embryí (především pokud jde o embrya dechorionovaná), kdy na Petriho misku o průměru 8–9 cm neumísťujeme více než 100 ks embryí. Druhý den přemísťujeme živá dechorionovaná embrya do druhého kultivačního média, ze kterého jsou za následujících 24–48 hodin převedena do běžné odstáté vodovodní vody. V případě mikroinjikace skrz chorion je možné držet embrya v odstáté vodovodní vodě až do vykulení.



Obr. 12. *Manipulace a mikroinjikace dechorionovaných jiker. A) Pro přenos dechorionovaných jiker je vhodné používat skleněné Pasteurovo pipety o průměru cca 2 mm. B) Embrya umístěná na misku s agarem vytvořenou pomocí forem. C) Zvětšený záběr na embrya. D) Mikroinjikace dechorionovaných embryí ve světlém poli a na fluorescenčním kanálu, kdy je jasně patrný signál z mikroinjikovaného rhodamin dextranu (E) (Foto: R. Franěk).*



Obr. 13. *Mikroinjikace rhodmain dextranu do nedechoriovaných jiker. A) Penetrace chorionu a embrya mikrokapilárou umístěnou pod animální pól do horní poloviny žloutku. B) Vstříknutí injikované tekutiny. C) Snímek na fluorescenčním kanálu, kdy je jasně zřetelný signál mikroinjikováného rodamin dextranu. D) Embryo po vytažení mikrokapiláry (Foto: R. Franěk).*

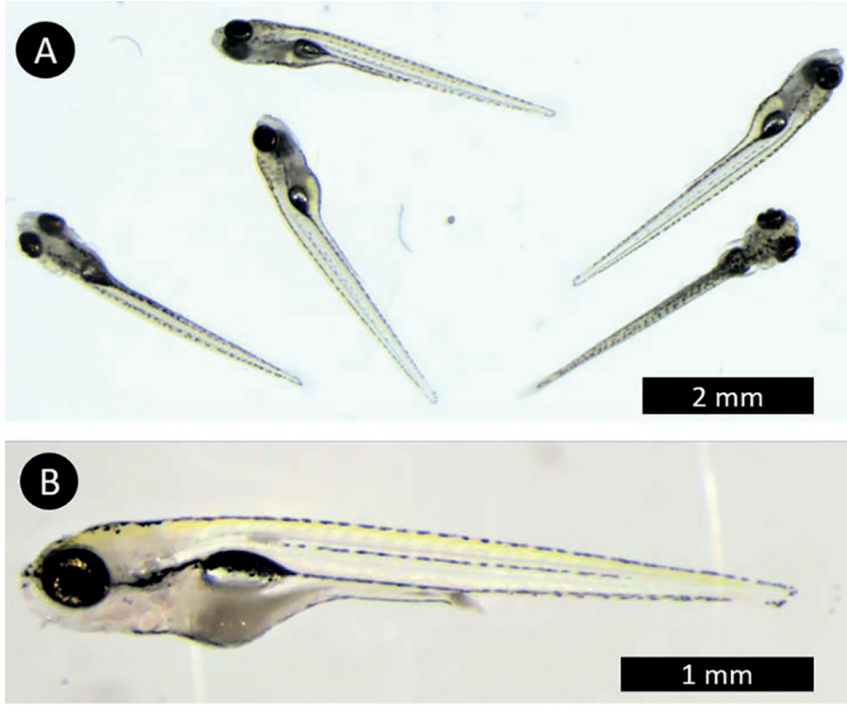


Obr. 14. *Transport injikovaného rhodamin dextranu ze žloutku do animálního pólu. A, B) Stadium jedné buňky, embryo je orientováno animálním pólem nahoru. C, D) Stadium 2 buněk. E, F) Stadium 8 buněk. G, H) Stadium 16 buněk. I, J) Stadium 128 buněk (Foto: R. Franěk).*

2.7. Odchov ryb

K rozplavání larev dánia dochází obvykle 5. den od oplození, při teplotě vody 28,5 °C. Krmení je vhodné zahájit po rozplavání většiny jedinců (Obr. 15). Předkládání krmení před tímto stadiem není v zásadě nutné, jelikož larvy mají stále dostatečnou zásobu energie ze žloutkového váčku. Zásadní limitací v rozkrmu dánia je velikost potravy, kdy ani nejmenší velikosti artemie nejsou příliš vhodné. Možností je živá potrava – trepka, případně vířníci nebo umělá dieta (na trhu je dostupných několik výrobců nabízejících krmení o velikosti části v řádu desítek mikronů). Z naší zkušenosti doporučujeme rozkrm trepkou, která je velmi nenáročná a lze ji chovat v dostatečném množství. V kultuře trepky se obvykle hojně vyskytují i vířníci, tudíž i menší larvy mají dostupnou potravu. Povaha trepky navíc umožňuje její předkládání v nadbytku, neboť uhynulé trepky a další organické zbytky jsou trepkami požírány.

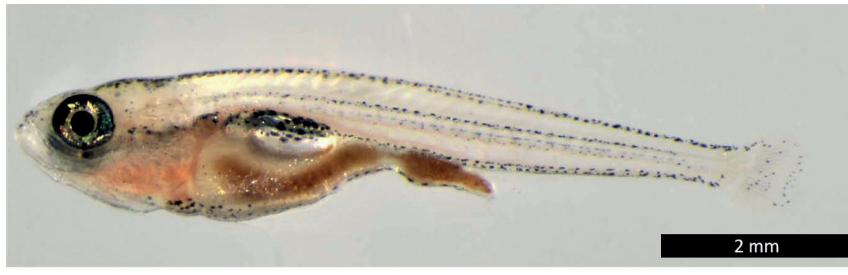
Násadu trepky je vhodné získat ze zavedené kultury od chovatele, případně lze zakoupit od specializovaných dodavatelů. Není doporučeno se pokoušet o založení kultury „naočkováním“ materiálu nejistého původu (např. venkovní nebo z filtračního média), kdy je možné zavlečení patogenů do chovu. Kulturu trepky udržujeme v temperovaných podmínkách (optimum je 25–28 °C), krmíme dle potřeby čerstvým vaječným žloutkem (cca 5 kapek jednou za dva týdny) a zároveň udržujeme mírnou salinitu v kultuře (0,5 g kuchyňské soli na litr kultury) jako prevenci výrazného nárůstu řas. Je vhodné mít kulturu trepek rozdělenou do více nádob, jelikož každá nádoba bude mít jinou dynamiku růstu populace v průběhu času a dostupnosti potravy. Alternativně lze trepku krmit násadou bakterií, které kultivujeme v oddělené nádobě, kde po 2–3 dnech po přidání vaječného žloutku či mléka dojde k rapidnímu nárůstu bakterií. Tuto krmenou kulturu pro trepku následně doplňujeme přímo do kultivačních nádob.



Obr. 15. *Rozplavané larvy dánia pruhovaného s téměř stráveným žloutkovým váčkem (A). B) Larva dánia pruhovaného několik hodin po začátku exogenní výživy. V zažívací traktu se nachází šedá masa, což indikuje, že larvy intenzivně přijímají předkládanou trepku (Foto: R. Franěk).*

V případě nedostupnosti živého krmiva je možné rozkrm larev započít suchou dietou, kdy jsou na trhu dostupné směsi vyrobené pro dánio, případně je možné využít běžněji dostupná krmiva o vhodné velikosti částic. Suché krmivo je třeba předkládat několikrát denně. Povaha rozkrmu larev suchým krmivem naráží na skutečnost, že dochází k poměrně rychlé degradaci kvality vody, což je dáno právě výrazným nepoměrem mezi předkládaným a zkonzumovaným množstvím, ale i vysokou teplotou vody. Krmení suchou potravou je časově mnohem náročnější na samotné předkládání, ale i následné čistění (na povrchu odchovné nádoby se rychle vytváří film ze zbytků potravy), které musí být prováděno s maximální opatrností vzhledem k velikosti a křehkosti larev během prvních dnů. Navíc, larvy dánia nejeví zájem o krmivo na dně, proto je zásadní krmivo předkládat několikrát denně.

Přibližně po 5–7 dnech od začátku rozkrmu trepkou je možné přejít na krmení čerstvě vylíhlými naupliemi žábronožky solné (*Artemia salina*). Kvalitní dodavatel je schopen nabídnout různé velikosti artemie, kdy pro počáteční krmení lze využít vajíček s přídomkem „micro“, vylíhlá nauplia jsou přibližně o třetinu až polovinu menší než běžně používané artemie, tudíž je lze předkládat dříve. Artemii líhneme dle běžných postupů doporučených výrobcem a opět jí předkládáme v přebytku. Při předkládání artemie je důležité pozorovat potravní chování larev a ujistit se, že jsou schopny vzhledem ke své velikosti artemii pozřít. Dobrým vodítkem je přítomnost zkonzumované artemie v zažívacím traktu, což lze pozorovat pouhým okem (Obr. 16).



Obr. 16. *Juvenil dánia (12 dní po oplození) s naplněným zažívací traktem předkládanou artemií – žábronožkou solnou (Foto: R. Franěk).*

Životaschopnost vylíhlé artemie lze výrazně prodloužit zvýšením salinity, doporučujeme dávku 1–1,5 g gramu kuchyňské soli na litr vody. Tato dávka nepředstavuje riziko pro juvenilní dánia, zároveň nám zajistí, že předkládaná artemie obvykle přežívá minimálně 12–18 hodin. Díky tomu mají dánia dostupnou živou potravu po delší časový úsek. Navíc je tím značně eliminováno riziko degradace kvality vody z důvodu úhynu nezkonzumované artemie. Artemií krmíme dle potřeby obvykle do 3.–4. týdne věku, kdy je možné ryby poměrně bezpečně držet v prostředí temperovaného inkubátoru v nádobách s vodou bez nutnosti filtrace vody či vzduchování, kdy je postačující pouze částečná výměna vody 1x za den.

Po dosažení 3–4 týdnů věku ryby přesouváme do chovného systému, kde přecházíme na krmení suchou dietou o vhodné velikosti částic (150–300 μm). Dřívější přesun ryb do hlavního systému není v zásadě nutný, navíc by bylo potřebné předkládat živou potravu ve výrazném přebytku, jelikož dochází k jejímu odplavování vlivem cirkulace vody. Při přesunu ryb do chovného systému předkládáme artemii v menších dávkách, kterou ryby ihned konzumují. Ryby přijímají artemie ochotně po celý život a zároveň pro ně představuje jisté zpestření, ačkoliv je známé, že se z hlediska profilu

mastných kyselin nejedná o kompletní krmivo (Tamaru a kol., 1998). Ryby mezi 1.–3. měsícem věku krmíme dle potřeby po menších dávkách (minimálně 3x denně). Regulací teploty a krmného režimu lze vhodně ovlivňovat reprodukční kondici ryb. V případě potřeby intenzivní produkce jiker držíme ryby na horní hranici teplotního optima (28,5 °C) a suché krmivo předkládáme minimálně 3x denně v dostatečném množství. Vhodným vodítkem pro dávkování krmiva je, že předložené krmivo by mělo být zkonzumováno do jedné minuty. V případě momentální nepotřebnosti produkce gamet doporučujeme snížit teplotu na 25 °C a zároveň mírně snížit množství předkládaného krmiva. Toto opatření pomáhá prodloužit období aktivní reprodukce, kdy dochází ke zpomalení dozrávání gamet. V případě potřeby gamet zvyšujeme teplotu a přecházíme na intenzivnější krmný režim, kdy se ryby dostávají během 2–3 týdnů zpět do plné reprodukční kondice.

2.8. Chromozomové manipulace

Techniky chromozomových manipulací u ryb představují přístupy, kdy ovlivňujeme celé sádky chromozomů. Jedná se především o ovlivnění ploidních stavů, mezi které řadíme indukci triploidie, tetraploidie a indukci uniparentální dědičnosti – androgeneze a gynogeneze. Uniparentální dědičnost je zásadním nástrojem pro screeningové studie recesivních alel, ale i mutageneze, kdy je v první generaci jedinec exponovaný mutagenům s následnou gynogenetickou nebo androgenetickou reprodukcí a následnou identifikací mutantních fenotypů na homozygotním potomstvu. Zároveň nelze opomenout uniparentální dědičnost jako nástroj pro produkci izogenních (klonálních) linií. U dánia lze tvrdit, že indukce polyploidie je spíše na okraji zájmu, jelikož případná aplikace triploidních a tetraploidních ryb je poměrně okrajová. Navíc indukce triploidie naráží na skutečnost, že se pohlavně diferencují pouze v samce. U tetraploidie je překážkou 100% mortalita tetraploidních jedinců, kdy hynou po vykulení.

2.8.1. Uniparentální dědičnost

Principem této manipulace je produkce potomstva, které má genom pouze z jednoho rodičů. V případě zachování genomu samice hovoříme o gynogenezi a v případě zachování genomu samce hovoříme o androgenezi. Gynogenezi dále dělíme na meiotickou – diploidní stav je obnoven zadržením druhého pólového tělíska a gynogenezi mitotickou, kdy diploidní stav obnovujeme zastavením rozchodu chromozomů během prvního dělení. Proces indukce uniparentální dědičnosti se skládá ze dvou kroků – inaktivace genomu gamet jednoho z rodičů a případné obnovení diploidního stavu (pokud není cílem produkovat haploidní potomstvo) (Obr. 18).

Indukce androgenetických haploidů

V případě androgeneze je cílem dosáhnout eliminace jaderné DNA jikry. Toho lze docílit ionizujícím zářením, kdy nejběžnějším způsobem je použití UV lampy, případně specializovaného zařízení tzv. crosslinkeru (Obr. 17). Pro zajištění rovnoměrného ozáření všech jiker je nutné použít médium, ve kterém se budou jikry volně pohybovat, avšak nedojde k jejich aktivaci. Doporučovaným roztokem pro manipulaci a ozáření jiker dánia je Hankův roztok s přídavkem 0,5% hovězího sérového albuminu a pH 8. Pro přípravu 100 ml Hankova roztoku pro androgenezi použijeme:

- 80 ml destilované vody
- 800 mg NaCl
- 40 mg KCl
- 14 mg $CaCl_2$
- 10 mg $MgSO_4$-$7H_2O$
- 10 mg $MgCl_2$-$6H_2O$
- Na_2HPO_4-$2H_2O$
- 6 ml KH_2PO_4
- 100 mg D-Glukózy
- 35 mg $NaHCO_3$
- 500 mg hovězího sérového albuminu v případě lyofilizovaného produktu nebo 500 µl tekutého séra
- Za stálého měření pH a míchání přidáváme roztok 1M NaOH do dosažení pH 8.
- Doplníme celkový objem na 100 ml.

Poznámka – hovězí sérový albumin může v roztoku podléhat rychlé degradaci, proto doporučujeme vždy připravovat čerstvý roztok nebo připravit zásobní roztok, kdy hovězí sérový albumin přidáváme těsně před použitím. Jako alternativu k Hankovo roztoku lze použít ovariální tekutinu pstruha duhového nebo 100% fetální hovězí sérum.

Na vytřené jikry nanášíme Hankův roztok v dostatečném množství, aby došlo k jejich rozprostření, mírným protřepáním zajistíme oddělení jednotlivých jiker od sebe. Nedoporučujeme se dotýkat jiker v Hankově roztoku jakýmkoliv předmětem. Jikry v Petriho misce umístíme do crosslinkeru, který je položený na laboratorní třepačku pro zajištění kontinuálního pohybu jiker během procesu ozáření a nastavíme požadovanou dávku ozáření. Pro efektivní ozáření volíme dávku 50–75 µJ/cm^2. Nižší dávky vedou k neúplné inaktivaci jaderné DNA, naopak dávky vyšší rapidně snižují již tak nízké přežití embryí. Po dokončení procesu ozáření je nutné neprodleně přistoupit k oplození. Vzhledem k vysoké osmolalitě Hankova roztoku je nutné jeho odstranění z jiker, jelikož by nemuselo dojít k oplození, respektive k aktivaci motility spermií. Roztok odstraníme

mikropipetou, případně použitím jemného papírového kapesníku. Pro samotné oplození je vhodné použít vysokou dávku spermatu, které aktivujeme větším množstvím vody, čímž zajistíme dostatečné naředění případných zbytků Hankova roztoku. Výsledkem androgeneze je produkce haploidních embryí, kdy úspěšnost samotné androgeneze lze ověřit průtokovou cytometrií, která měří relativní obsah DNA. Ten by měl odpovídat polovině v porovnání s normálním oplozením. Další možností ověření úspěšnosti androgeneze je použití spermatu samce s recesivním fenotypem zbarvení (např. golden, casper), kdy právě přítomnost nepigmentovaných, případně slabě pigmentovaných larev značí úspěšnou inaktivaci DNA jiker. Pro robustní ověření volíme molekulární metody, jakými jsou například analýza délky mikrosatelitních lokusů, případně Restriction-site associated DNA sekvenování, které pokrývá násobně větší část genomu než mikrosatelity.

Indukce gynogenetických haploidů

Podstatou gynogeneze je inaktivace paternální DNA spermií, avšak se zachováním motility pro aktivaci vajíčka. Určitou limitací při použití dánia je množství spermatu, respektive celkový objem, který ozařujeme. Ten se pohybuje v řádu desítek mikrolitrů. Odebrané sperma od jednoho samce dánia (předpokládáme odebrání 1 µl spermatu) je vhodné umístit do objemu 25–50 µl imobilizačního roztoku. Doporučujeme odebrat sperma od více samců, aby finální objem pro ozařování byl minimálně 100 µl. Odebrané sperma naneseme na Petriho misku a umístíme do crosslinkeru na laboratorní třepačce. Alternativně lze nanést sperma na běžné mikroskopické sklíčko (nepoužívat sklíčka s povrchovou úpravou, jelikož zvyšují povrchové napětí vody). Povrch Petriho misky nebo sklíčka je vhodné zdrsnit jemným smirkovým papírem, případně alespoň poškrábat injekční jehlou. Tento zásah výrazně pomáhá lepšímu rozprostření spermatu po ploše, a tím je zajištěna rovnoměrnější administrace ozáření. Ozařujeme dávkou 300 000 µJ/cm^2. V polovině průběhu ozařování doporučujeme ozařování pozastavit, promíchat ozařované sperma a následně proces dokončit. Po dokončení ozáření je vhodné sperma ihned použít k oplození, případně ho uchováváme na ledu a v temnu pro zamezí aktivace opravných procesů DNA. Na 100 ks jiker počítáme 25 µl ozářeného spermatu, které aktivujeme 250 µl vody.

Vhodnou alternativou je použití spermatu jiného druhu. Experimentálně máme dobré zkušenosti se spermatem kapra obecného, které je obvykle dostupné ve více než dostačeném množství, které je potřebné pro oplození jiker dánia. Další výhodou je vlastní neživotaschopnost hybridů dánia a kapra, kteří nepřežívají déle než 24 h po oplození, a navíc mají velmi abnormální embryonální vývoj. V případě použití kapřího spermatu pro indukci gynogeneze postupujeme dle metodiky Kašpara a kol. (2013). Odebrané kapří

sperma ředíme v poměru 1 : 9 s roztokem Kurokura 180. Naředěné sperma nanášíme v tenké vrstvě na Petriho misku a rozprostřeme po celém povrchu. Ozařujeme dávkou 300 000 μJ/cm^2 za stálého třepání na laboratorní třepačce. Ozářené sperma odebíráme pipetou a uchováme v mikrozkumavkách na ledu a chráníme před světlem. K oplození je vhodné přistoupit neprodleně. Na 100 jiker počítáme 10 μl ozářeného spermatu, které aktivujeme 100 μl vody.

Rediploidizace

Výše popsaná indukce adrogeneze a gynogeneze vede k produkci haploidních jedinců, kteří zpravidla nepřežívají déle než 5–7 dní (nejsou schopni rozplavání a zahájení exogenní výživy). Pro produkci životaschopných gynogenetických a androgenetických jedinců je nutná rediplodizace – obnova diploidního stavu. V případě gynogeneze lze rediploidizovat v průběhu dokončující se meiózy, kdy zadržujeme druhé pólové tělísko (meiotická gynogeneze), nebo v průběhu první mitózy, kdy zastavujeme první buněčné dělení (mitotická gynogeneze). Meiotická gynogeneze dává vzniknout částečně homozygotním jedincům, jelikož v průběhu gametogeneze dochází k rekombinaci chromozomů. Výsledkem mitotické gynogeneze je plně homozygotní jedinec, jelikož duplikujeme jednu sadu chromozomů, za vzniku dvou identických sad chromozomů.

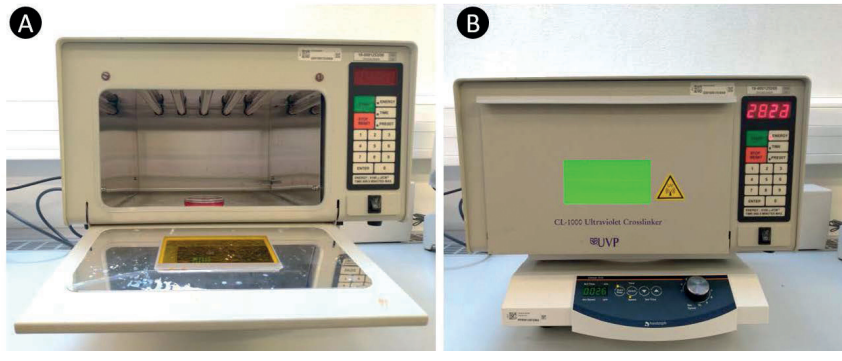
Rediploidizace pro meiotickou gynogenezi

Pro meiotickou gynogenezi lze použít tlakového nebo teplotního šoku, kdy v obou případech je naprosto zásadní dodržení načasování a velmi rychlou práci s oplozenými jikrami. Pro tlakový šok lze postupovat dle metodiky Walker a kol. (2009), kdy v 90. sekundě od oplození je v tlakovém válci aplikován šok o intenzitě 500–600 kg/cm^2 po dobu 4,5 min.

Pro teplotní šok je postačující vyhřívaná lázeň o konstantní teplotě. Kdy samotné provedení šoku odpovídá protokolu pro indukci triploidů (Franěk a kol., 2019). Kdy jsou oplozené jikry převedeny do čajového sítka a 2 min po oplození ponořeny do lázně o teplotě 41,4 °C po dobu 2 min.

Rediploidizace pro mitotickou gynogenezi a androgenezi

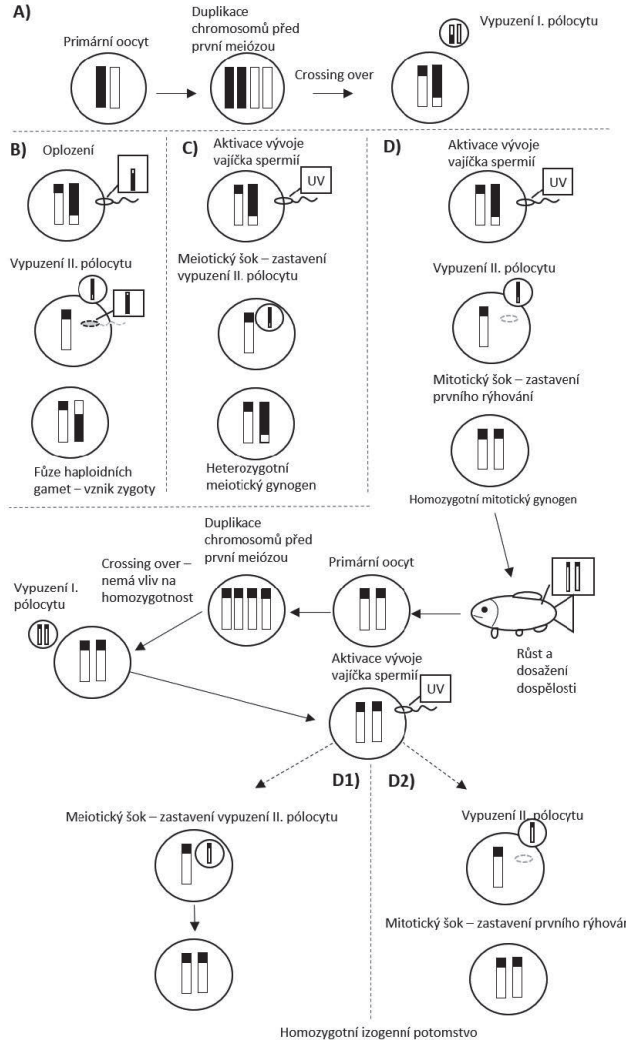
V případě potřeby produkce plně homozygotních jedinců je doporučeným postupem teplotní šok. Po aktivaci přemístíme jikry do temperovaného inkubátoru (28,5 °C). Teplotní šok o intenzitě 41,4 °C a trvání 2 min. Začátek administrace šoku je značně variabilní. Na základě naší zkušenosti a dostupné literatury je možné používat šoky začínající v rozmezí 11–20 min po oplození bez výrazných rozdílů v úspěšnosti rediploidizace.



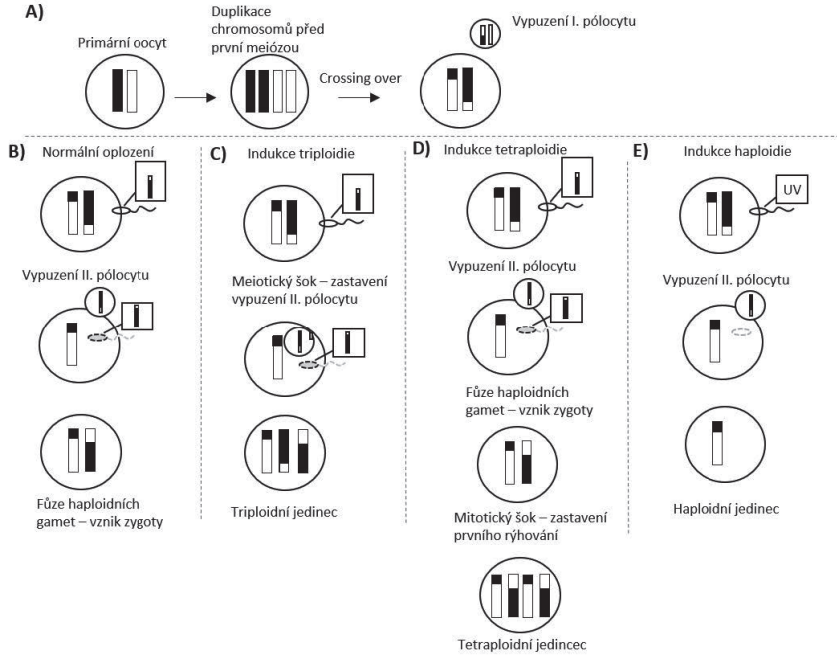
Obr. 17. *Ozařování jiker UV záření pro androgenezi. A) Jikry jsou umístěné na Petriho misce v Hankově roztoku pro adrogenezi. B) Ozařování jiker v crosslinkeru za současného třepání pro zajištění rovnoměrné distribuce ozáření (Foto: R. Franěk).*

2.8.2. Indukce polyploidních stavů

Postupy pro navození triploidie a tetraploidie využívají stejných šokových ošetření, která jsou používána u meiotické a mitotické gynogeneze. Rozdílem je, že nedochází k inaktivaci DNA gamet jednoho z rodičů pomocí ionizujícího záření. V případě triploidie lze bez větších obtíží indukovat maternální triploidy. Toto označení plyne ze skutečnosti, že triploidní jedinci mají dvě sádky chromozomů maternálního původu (oocyt a druhý pólocyt) a jednu sádku chromozomů od samce (spermie) (Obr. 19). Pro indukci triploidie i tetraploidie je nutné odebrat gamety obou pohlaví stejným způsobem jako pro *in vitro* oplození. Oplozené jikry je nutné ihned přesunout do inkubátoru temperovaného na 28,5 °C. Pro indukci triploidie je aplikován teplotní šok 2 minuty po oplození o teplotě 41,4 °C po dobu dvou minut. Tetraploidie je indukována stejným způsobem s rozdílem v době začátku šokového ošetření. Ten je aplikován 11–20 min po oplození.



Obr. 18. *Schéma indukce uniparentální dědičnosti pomocí gynogeneze. A) První meiotické dělení. B) Normální proces oplození dává vzniku diploidnímu jedinci, který má jednu sádku chromozomů od matky a druhou sádku chromozomů od otce. C) Meiotická gynogeneze. D) Mitotická gynogeneze, kdy v první generaci vznikají homozygotní jedinci. Při dalším rozmnožením homozygotních jedinců pomocí uniparentální dědičnosti – meiotickou gynogenezí (D1) nebo mitotickou gynogenezí (D2) vzniká izogenní linie. UV – spermie s inaktivovanou DNA pomocí UV ionizujícího záření.*



Obr. 19. *Schéma chromozomových manipulací pro ovlivnění ploidie. A) Oogeneze v těle samice. B) Normální proces oplození dávají vzniku diploidnímu jedinci, který má jednu sádku chromozomů od matky a druhou sádku chromozomů od otce. C) Indukce triploidie pomocí zadržení II. pólocytu. D) Indukce tetraploidie pomocí mitotického šoku. E) Indukce haploidie oplozením UV ošetřeným spermatem.*

3. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Tato metodika je příručkou pro chov dánia pruhovaného s popisem základních metod, které nalézají uplatnění v molekulární a buněčné biologii. V současné době dánio pruhované patří mezi nejpoužívanější modelové obratlovce na světě, nicméně doposud chybí základní přehled jeho využití v českém jazyce, který může být nápomocný pro základní orientaci začátečníkům, ale i studentům. Metodika se zakládá na několikaletých zkušenostech pracovníků laboratoře s chovem a manipulacemi s dániem, do kterého byly promítnuty poznatky získané prací i s dalšími druhy ryb, především z pohledu odchovu a rozmnožování, které mohou pomoci zefektivnit postupy na pracovišti.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Předložená metodika poskytuje základní a nezbytné informace pro prvotní zavedení dánia do laboratorního chovu včetně odkrmu raných stadií. Použitím postupů v předkládané metodice lze zefektivnit procesy a práci spojenou s držením dánia pruhovaného v laboratorním chovu. Spolu s popisem manipulačních a mikroinjikačních technik nalezne metodika uplatnění u naprostých začátečníků s chovem a použitím dánia v laboratoři. Metodika nalezne uplatnění v kurzech zaměřených například na molekulární biologii, genetiku, vývojovou biologii či toxikologii, jelikož v těchto oborech je dánio významným modelovým druhem a seznámení se s jeho chovem a základními technikami práce je naprosto zásadní.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Metodika popisuje základní postupy a techniky pro práci s dániem v laboratoři. Přímé ekonomické dopady je obtížné vyčíslit, nicméně při úvaze začlenění zmíněných postupů, především pak držení v recirkulačním systému a rozkrmu raných stadií, lze s jistotou očekávat, že dojde k výraznému zefektivnění práce v dané laboratoři. Držením v intenzivním systému dochází k výrazné úspoře prostorových, ale především časových nároků, které jsou kladeny na obsluhující personál. Využití živé potravy na počátku rozkrmu larev zásadně zvyšuje šance na jejich přežití, což zároveň snižuje počty embryí, které je nutné produkovat, a případně s nimi manipulovat.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aleström, P., D'Angelo, L., Midtlyng, P.J., Schorderet, D.F., Schulte-Merker, S., Sohm, F., Warner, S., 2020. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. Laboratory Animals 54: 213–224.

Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M., Hopkins, N., 1999. A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. Genes and Development 13: 2713–2724.

Brown, A.R., Bickley, L.K., Ryan, T.A., Paull, G.C., Hamilton, P.B., Owen, S.F., Sharpe, A.D., Tyler, C.R., 2012. Differences in sexual development in inbred and outbred zebrafish (*Danio rerio*) and implications for chemical testing. Aquatic Toxicology 112: 27–38.

Chakrabarti, S., Streisinger, G., Singer, F., Walker, C., 1983. Frequency of γ-ray induced specific locus and recessive lethal mutations in mature germ cells of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Genetics 103: 109–123.

Cheng, Y., Franěk, R., Rodina, M., Xin, M., Cosson, J., Linhart, O., 2021. Optimization of Sperm Storage and Fertilization in Zebrafish [*Danio rerio* (Hamilton)]. Animals 11: 1558.

Crim, M.J., Lawrence, C., 2021. A fish is not a mouse: understanding differences in background genetics is critical for reproducibility. Lab Animal 50: 19–25.

Dabrowski, K., Miller, M., 2018. Contested paradigm in raising zebrafish (*Danio rerio*). Zebrafish 15: 295–309.

Delomas, T.A., Dabrowski, K., 2019. Improved protocol for rapid zebrafish growth without reducing reproductive performance. Aquaculture Research 50: 457–463.

Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C.F., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y.R., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., Boggs, C., 1996. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. Development 123: 37–46.

Endoh, M., Fujimoto, T., Yamaha, E., Arai, K., 2018. Improved procedure for induction of the androgenetic doubled haploids in zebrafish. Zebrafish 15: 33–44.

Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., 2007. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. Zebrafish 4: 21–40.

Franěk, R., Baloch, A.R., Kašpar, V., Saito, T., Fujimoto, T., Arai, K., Pšenička, M., 2020. Isogenic lines in fish – a critical review. Reviews in Aquaculture 12: 1412–1434.

Franěk, R., Tichopád, T., Fučíková, M., Steinbach, C., Pšenička, M., 2019. Production and use of triploid zebrafish for surrogate reproduction. Theriogenology 140: 33–43.

Geisler, R., Köhler, A., Dickmeis, T., Strähle, U., 2017. Archiving of zebrafish lines can reduce animal experiments in biomedical research. EMBO Reports 18: 1–2.

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., Van Eeden, F.J.M., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., Nüsslein-Volhard, C., 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. Development 123: 1–36.

Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., et al., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature 496: 498–503.

Kašpar, V., Rodina, M., Flajšhans, M., 2013. Hromadná indukce gynogeneze a androgeneze u kapra obecného (*Cyprinus carpio*). Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 143, 29 s.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics 203: 253–310.

Kossack, M.E., Draper, B.W., 2019. Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*). Current Topics in Developmental Biology 134: 119–149.

Lawson, N.D., Li, R., Shin, M., Grosse, A., Onur, Y.M.S., Stone, O.A., Kucukural, A., Zhu, L.J., 2020. An improved zebrafish transcriptome annotation for sensitive and comprehensive detection of cell type-specific genes. eLife 9: e55792

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. Biology of Reproduction 81: 177–187.

Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. Nature Reviews Genetics 8: 353–367.

Liew, W.C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K.R., Orban, L., 2012. Polygenic sex determination system in zebrafish. PLoS ONE 7: e34397

Liew, W.C., Orbán, L., 2014. Zebrafish sex: a complicated affair. Briefings in functional genomics 13: 172–187.

Ma, D., Liu, F., 2015. Genome editing and its applications in model organisms. Genomics, Proteomics and Bioinformatics 13: 336–344.

Matthews, J.L., Murphy, J.M., Carmichael, C., Yang, H., Tiersch, T., Westerfield, M., Varga, Z.M., 2018. Changes to extender, cryoprotective medium, and *in vitro* fertilization improve zebrafish sperm cryopreservation. Zebrafish 15: 279–290.

Moens, C.B., Donn, T.M., Wolf-Saxon, E.R., Ma, T.P., 2008. Reverse genetics in zebrafish by TILLING. Briefings in Functional Genomics and Proteomics 7: 454–459.

Nasevicius, A., Ekker, S.C., 2000. Effective targeted gene "knockdown" in zebrafish. Nature Genetics 26: 216–220.

Parichy, D.M., 2015. The natural history of model organisms: Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. eLife 4: e05635.

Reed, B., Jennings, M., 2011. Guidance on the housing and care of zebrafish *Danio rerio*. Research Animals Department, Science Group, RSPCA 1–27.

Ribas, L., Liew, W.C., Díaz, N., Sreenivasan, R., Orbán, L., Piferrer, F., 2017. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific & yields a set of different gonadal transcriptomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114: E941–E950.

Rodina, M., Cosson, J., Gela, D., Linhart, O., 2004. Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.). Aquaculture International 12: 119–131.

Schnurr, M.E., Yin, Y., Scott, G.R., 2014. Temperature during embryonic development has persistent effects on metabolic enzymes in the muscle of zebrafish. Journal of Experimental Biology 217: 1370–1380.

Singh, A.P., Dinwiddie, A., Mahalwar, P., Schach, U., Linker, C., Irion, U., Nüsslein-Volhard, C., 2016. Pigment cell progenitors in zebrafish remain multipotent through metamorphosis. Developmental Cell 38: 316–330.

Siripattarapravat, K., Pinmee, B., Venta, P.J., Chang, C.-C., Cibelli, J.B., 2009. Somatic cell nuclear transfer in zebrafish. Nature Methods 6: 733–735.

Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010, o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biological Reviews 83: 13–34.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature 291: 293–296.

Stuart, G.W., McMurray, J.V., Westerfield, M., 1988. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. Development 102: 403–412.

Tamaru, C.S., Ako, H., Pang, L., 1998. Enrichment of artemia for use in freshwater ornamental fish production. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture 133.

Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., Xie, M., Gao, C., Ye, Y., Duan, M., Zhou, Z., 2019. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. Animal Frontiers 9: 68–77.

Vesterlund, L., Jiao, H., Unneberg, P., Hovatta, O., Kere, J., 2011. The zebrafish transcriptome during early development. BMC Developmental Biology 11: 30.

Waghmare, S.G., Samarin, A.M., Franěk, R., Pšenička, M., Policar, T., Linhart, O., Samarin, A.Z., 2021. Oocyte ageing in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) and its consequence on the viability and ploidy anomalies in the progeny. Animals 11: 912.

Walker, C., Streisinger, G., 1983. Induction of mutations by γ-rays in pregonial germ cells of zebrafish embryos. Genetics 103: 125–136.

Walker, C., Walsh, G.S., Moens, C., 2009. Making gynogenetic diploid zebrafish by early pressure. Journal of Visualized Experiments 28: 1396.

Westerfield, M., 2007. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition. University of Oregon Press, Eugene.

Whiteley, A.R., Bhat, A., Martins, E.P., Mayden, R.L., Arunachalam, M., Uusi-Heikkilä, S., Ahmed, A.T.A., Shrestha, J., Clark, M., Stemple, D., Bernatchez, L., 2011. Population genomics of wild and laboratory zebrafish (*Danio rerio*). Molecular Ecology 20: 4259–4276.

Wilson, C.A., High, S.K., McCluskey, B.M., Amores, A., Yan, Y., Titus, T.A., Anderson, J.L., Batzel, P., Carvan, M.J., Schartl, M., Postlethwait, J.H., Postlethwait, J.H., 2014. Wild sex in zebrafish: loss of the natural sex determinant in domesticated strains. Genetics 198: 1291–308.

Yang, H., Luan, Y., Liu, T., Lee, H.J., Fang, L., Wang, Y., Wang, X., Zhang, B., Jin, Q., Ang, K.C., Xing, X., Wang, J., Xu, J., Song, F., Sriranga, I., Khunsriraksakul, C., Salameh, T., Li, D., Choudhary, M.N.K., Topczewski, J., Wang, K., Gerhard, G.S., Hardison, R.C., Wang, T., Cheng, K.C., Yue, F., 2020. A map of cis-regulatory elements and 3D genome structures in zebrafish. Nature 588: 337–343.

Zákon České národní rady č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Cheng, Y., Franěk, R., Rodina, M., Xin, M., Cosson, J., Linhart, O., 2021. Optimization of sperm storage and fertilization in zebrafish [*Danio rerio* (Hamilton)]. Animals 11: 1558.

Franěk, R., Baloch, A.R., Kašpar, V., Saito, T., Fujimoto, T., Arai, K., Pšenička, M., 2019. Isogenic lines in fish – a critical review. Reviews in Aquaculture 12: 1412–1434.

Franěk, R., Tichopád, T., Fučíková, M., Steinbach, C., Pšenička, M., 2019. Production and use of triploid zebrafish for surrogate reproduction. Theriogenology 140: 33–43.

Waghmare, S.G., Samarin, A.M., Franěk, R., Pšenička, M., Policar, T., Linhart, O., Samarin, A.Z., 2021. Oocyte ageing in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) and its consequence on the viability and ploidy anomalies in the progeny. Animals 11: 912.

Dedikace

Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky – projekty CENAKVA (LM2018099) a Biodiverzita (Reprodukční a genetické postupy pro uchování biodiverzity ryb a akvakulturu) (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007370) – 50 %, Národní agentury pro zemědělský výzkum QK1910428 Uchovávání genetických zdrojů kapra obecného in vitro a tvorba isogenních linií pomocí transplantace zárodečných buněk – 50 %.

Poznámky

Poznámky