



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

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



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

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

Metody stabilní produkce diploidních gamet pomocí náhradních rodičů pro účely triploidizace v akvakultuře

R. Franěk, M. Pšenička



ISBN 978-80-7514-129-3





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

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

Metody stabilní produkce diploidních gamet pomocí náhradních rodičů pro účely triploidizace v akvakultuře

R. Franěk, M. Pšenička

Vodňany



EVROPSKÁ UNIE
Evropský námořní a rybářský fond
Operační program Rybářství

Příprava a vydání publikace byly uskutečněny v rámci

Operačního programu Rybářství 2014–2020:

Projekt Technologie II, reg. č. CZ.10.5.109/5.2/4.0/19_014/0000893

byl spolufinancován Evropskou unií

Obsahová část publikace byla zpracována

za finanční podpory následujících projektů:

Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky – projekty CENAKVA (LM2018099) – 25 % a Biodiverzita (Reprodukční a genetické postupy pro uchování biodiverzity ryb a akvakulturu) – 25 % (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_025/0007370) a projektu Technologické agentury České republiky TA ČR GAMA TG 030100027, PoC 01-10-Pšenička – 50 %.



č. 182

ISBN 978-80-7514-129-3

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 1. ÚVOD | 7 |
| 2. CÍL | 11 |
| 3. MÍSTO OVĚŘENÍ TECHNOLOGIE | 12 |
| 4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY | 12 |
| 4.1. Generační ryby | 12 |
| 4.2. Umělá reprodukce recipientů | 13 |
| 4.3. Indukce tetraploidie | 16 |
| 4.4. Transplantace zárodečných kmenových buněk | 19 |
| 4.5. Reprodukce chimér zárodečné linie | 26 |
| 5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS | 28 |
| 6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRAXI | 29 |
| 7. SEZNAM LITERATURY | 30 |

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

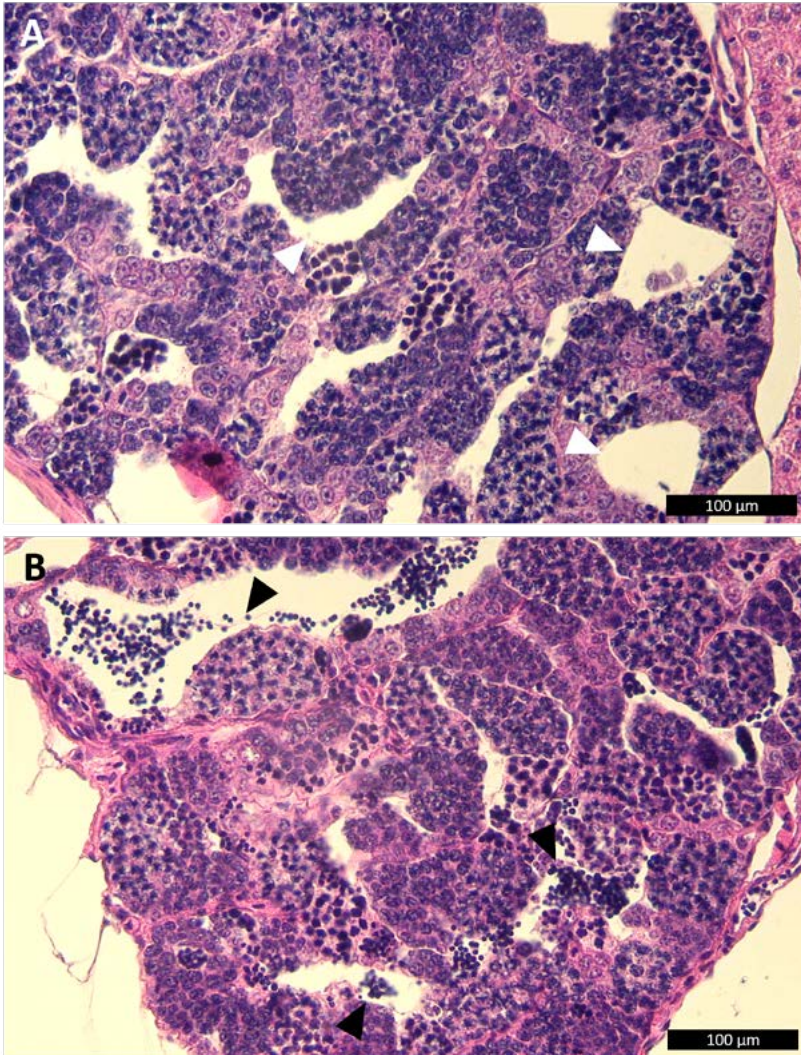
1. ÚVOD

Ryby produkované v akvakultuře jsou velmi významnou komoditou, která se zásadně podílí na nasycení lidstva. Akvakultura je stále nejrychleji rostoucím odvětvím sektoru produkce potravin, tudíž pozice ryb jakožto zdroje živočišných bílkovin, bude s rostoucí lidskou populací stále nabývat na významu (FAO, 2020).

Obecně je chov ryb v akvakultuře podmíněn dostatkem znalostí o jejich požadavcích na fyzikální a chemické parametry prostředí a znalostmi o výživě a přijmutí opatření, která zlepšují využití potenciálu předkládaného krmiva.

Jedním z nástrojů pro zefektivnění produkce ryb je kontrola pohlavního dospívání, která nabývá významu u těch druhů, které jsou před dosažením tržní velikosti již plodní. V případě dosažení retardace pohlavního vývoje či sterility lze očekávat zlepšení ekonomiky chovu, jelikož je předpokládáno, že energie v předkládaném krmivu je využita na somatický růst a není „plýtvána“ na tvorbu gamet a případně i agresí spojenou s pohlavním vývojem a nástupem pohlavního chování (Piferrer a kol., 2009; Taranger a kol., 2010). Sterilní ryby zároveň představují eliminaci rizika genetické kontaminace při úniku z farmových chovů do volných vod, což je aktuální např. v klecovém chovu lososa a využití geneticky upravených ryb, u kterých je zajištění sterility vyžadováno legislativou.

Jedním z nástrojů pro produkci sterilních ryb je indukce triploidie. Ryby jsou obecně tolerantní k manipulacím s celými sety chromozomů, jako je polyploidie (Zhou a Gui, 2017) a uniparentální dědičnost (Komen a Thorgaard, 2007; Franěk a kol., 2019a), které mohou být dosaženy relativně jednoduše a protokoly pro výše zmíněné manipulace jsou poměrně podobné napříč jednotlivými druhy. Většina ryb má vnější oplození, což značně usnadňuje práci s gametami a chromosomové manipulace (Tiwary a kol., 2004). Indukovaný triploid může být sterilní (Franěk a kol., 2019b), nebo má alespoň do jisté míry sníženou reprodukční schopnost (Obr. 1). Tento jev je obecně přičítán tomu, že v případě přítomnosti tří sádek chromozomů nemůže dojít k rovnoměrné segregaci lichého počtu chromozomů v meiotické fázi gametogeneze (Felip a kol., 2001). Následkem toho mohou být gonády triploidů retardované a celoživotně ve fázi raného vývoje, případně dochází k částečné produkci gamet, které ale bývají aneuploidní (mají nekompletní sady chromozomů) (Piferrer a kol., 2009; Flajshans a kol., 2010;). Nicméně je nutné zmínit, že indukce triploidie není univerzálním řešením pro všechny druhy ryb za účelem kontroly sterility. Na příkladu lína obecného (Linhart a kol., 2006) a tresky obecné (*Gadus morhua*) (Feindel a kol., 2010) již bylo prokázáno, že samci produkují různě ploidní spermie, které mohou být oplozenischné stejně jako normální haploidní spermie produkované diploidními jedinci.



Obr. 1. Vývoj gonád u triploidního a diploidního jedince dánia pruhovaného. A) Triploid, lumen testes (označeno bílými šipkami) je prostý spermii. B) Diploid, v lumenu testes lze snadno nalézt spermie (označeno černými šipkami) (Foto: R. Franěk).

Doposud byl potenciál uměle indukovaných triploidů oproti diploidům ověřen zejména u druhů využívaných v akvakultuře. V juvenilním věku mají triploidi vyrovnané či horší růstové vlastnosti než diploidní kontrola. Rozdíl

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

v růstu lze pozorovat s příchodem a dosažením pohlavní dospělosti. Tyto výsledky byly publikovány u několika druhů sladkovodních i mořských ryb včetně komerčně významných, jako je losos atlantský (*Salmo salar*), pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), siven americký (*Salvenius fontinalis*), tilápie nilská (*Oreochromis niloticus*), lín obecný (*Tinca tinca*) a několika druhů asijských sumců (Piferrer a kol., 2009).

Stávající metody pro indukci triploidie u ryb jsou založeny na skutečnosti, že ovulované oocyty se nacházejí v metafázi II., což znamená, že uvnitř oocytu se nachází jádro i druhé pólóvé tělísko. Meióza II. je následně dokončena těsně po oplození spermií, kdy dochází k úplnému oddělení jádra oocytu a druhého pólóvého tělíška. Následně spolu fúzí dekondenzované samčí a samičí prvojádro za vzniku diploidní zygoty (Nagahama a Yamashita, 2008 ; Lubzens a kol., 2010). Mechanismus indukce triploidie zasahuje do dokončující se meiózy, konkrétně způsobuje depolymerizaci tubulinových vláken dělicího vřeténka, kdy dochází k zadržení druhého pólóvého tělíška. Výsledkem je diploidní jádro oocytu, které fúzuje s haploidní spermií a dává vzniknout triploidní zygotě. Pro dosažení zadržení pólóvého tělíška je nutné použít šok, který využívá přechodné změny teploty (studený či teplý šok) (Peruzzi a kol., 2007; Franěk a kol., 2019b), tlakového šoku (Flajšhans a kol., 1993) nebo elektrického šoku (Hassan a kol., 2018). Po aplikaci šokového ošetření lze předpokládat snížení přežití embryí, které bude záviset na přesnosti provedení šoku, zkušenosti pracovníků, ale i kvalitě gamet. Zároveň je nutné zmínit, že v případě aplikace chromozomových manipulací u ryb v produkčním měřítku pro účely akvakultury značně narůstá celková náročnost procesu z důvodu nutnosti ošetřit velké množství embryí. Tudíž je v praxi poměrně obtížné stabilně produkovat polyploidní ryby, jelikož míra úspěšnosti a přežití se může mezi jednotlivými výtěry velmi lišit.

Další možností pro indukci triploidie je křížení tetraploidních jedinců, kteří produkují diploidní gamety s normálními diploidními jedinci s haploidními gametami za vzniku triploidů bez nutnosti zásahů do raného embryonálního vývoje, což by činilo tuto metodu efektivnější z hlediska přežití, ale i méně pracnou v porovnání s umělou indukcí triploidie. Zároveň se pravděpodobně vyrovná růstový potenciál mezi diploidy a triploidy v juvenilním období a může dojít k markantnějšímu rozdílu růstu po dosažení pohlavní dospělosti. Indukce tetraploidie je založená na podobném principu jako triploidie, kdy jsou v rámci prvního či druhého mitotického dělení aplikovány fyzikální šoky, které brání rozchodu duplikovaných sad chromozomů a vzniká embryo, která má čtyři sady chromozomů (Flajšhans a kol., 1993). Teoreticky je možné tetraploidii indukovat u většiny druhů ryb, nicméně v porovnání s indukcí triploidie je přežití

tetraploidů drasticky nižší a nezdá se, že uměle indukovaní tetraploidi jsou neživotní (Herbst, 2002). Zároveň lze předpokládat, že umělé zdvojnásobení sádek chromozomů představuje spíše nevýhody, jelikož mimo jiné dochází k destabilizaci genové exprese, ale i dalším negativním vlivům na epigenetické úrovni (Piferrer a kol., 2009). Dle údajů z literatury je úspěšná reprodukce tetraploidů pro indukci triploidie popsána pouze u pstruha duhového (Chourrout a kol., 1986; Blanc a kol., 1987), což dokumentuje obtížnou aplikaci tohoto přístupu u ryb. Odlišná situace je u ústřic a dalších komerčně významných mlžů, kteří jsou k indukci tetraploidie mnohem více tolerantní a lze je v produkčním měřítku využívat pro produkci triploidů (Piferrer a kol., 2009).

Alternativou, která by potenciálně mohla vést k produkci triploidů, je použití mezidruhově hybridizace na příkladu kaprovitých ryb, kdy v rámci jednotlivých generací dochází k vyštěpení různě ploidních mezidruhově hybridů, a ve výsledku lze dosáhnout produkce jedinců, kteří jsou tetraploidní a produkují diploidní gamety nebo jsou diploidní a produkují neredukované gamety. Tato strategie je nicméně extrémně časově náročná (potřeba několika generačního křížení), zároveň neřeší problematiku, jak produkovat čistý triploidní druh. Zároveň lze očekávat i určitou nestabilitu fenotypu právě z důvodu kombinace dvou a více druhů v produkci kříženců (S. Wang a kol., 2019; Y. Wang a kol., 2019). Schopnost produkce neredukovaných gamet (tzn. mající stejnou ploidii jako somatické buňky), případně gamet z přirozeně se vyskytujících tetraploidních jedinců u piskoře dálnovýchodního (*Misgurnus anguillicaudatus*) (Arai a kol., 1993; Li a kol., 2012; Arai a Fujimoto, 2013), lze taktéž zmínit jako potenciální možnost pro indukci triploidie. Nicméně je zřejmé, že ve výše zmíněných případech se jedná o mimořádné výjimky, které nejsou široce aplikovatelné pro ostatní druhy ryb.

V rámci prezentované technologie jsme popsali a ověřili alternativní postup pro triploidizaci v akvakultuře, který využívá transplantace tetraploidních zárodečných kmenových buněk do diploidních recipientů, kteří po dosažení pohlavní dospělosti produkují diploidní spermie. Ty jsou použity pro oplození normálních haploidních oocytů za vzniku triploidních jedinců. Zárodečné kmenové buňky jsou unikátní populací buněk, která vzniká v průběhu raného embryonálního vývoje jako primordiální gonocyty (Starz-Gaiano a Lehmann, 2001). Tyto buňky jsou specifikovány materiálními determinanty a následně podstupují migraci do genitální rýhy (místo založení budoucí gonády), kde následně proliferují, diferencují se v samčí (spermatogoniální kmenové buňky) či samičí (oogoniální kmenové buňky) zárodečné buňky a produkují gamety (Hashimoto a kol., 2004). Prvně byla možnost izolace a transplantace zárodečných buněk do těl recipientů popsána u savců (myši), kde recipienti

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

po dosažení pohlavní dospělosti, produkovali gamety dárce (Brinster a Zimmermann, 1994). Následně byl tento biotechnologický přístup aplikován u ryb, kdy byly transplantovány blastomery (Lin a kol., 1992; Kusuda a kol., 2004), primordiální gonocyty (Takeuchi a kol., 2003; Saito a kol., 2010; Kawakami a kol., 2012), spermatogonie a ogonie (Yoshizaki a kol., 2010; Octavera a Yoshizaki, 2018; Franěk a kol., 2019b,c,d).

Současné poznání v rámci náhradního rodičovství ryb umožňuje zefektivnit tuto biotechnologii použitím mezidruhové transplantace. Tento přístup mimo jiné umožňuje indukovat náhradní rodičovství prostřednictvím menšího druhu recipienta, čímž zároveň dojde ke zmenšení prostorových nároků, jako tomu může například být u jeseterů, kde jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) může být ideálním náhradním rodičem pro velké druhy jeseterů, jako je například jeseter sibiřský (*Acipenser baerii*) (Pšenička a kol., 2016). Podobně je zamýšleno i o náhradních rodičích tuňáka australského (*Thunnus maccoyii*), kdy je cílem produkovat jeho gamety prostřednictvím menších příbuzných druhů (Yazawa a kol., 2013; Bar a kol., 2016). Další aplikací náhradního rodičovství je transplantace zárodečných buněk kapra obecného (*Cyprinus carpio*) do karasa zlatého (*Carassius auratus*), který je mimo jiné odolný vůči KOI herpes viru (Franěk a kol., 2019c,d). Samozřejmě lze využít i opačného schématu, kdy zárodečné kmenové buňky menšího druhu budou transplantovány do většího za účelem zvýšení produkce gamet, což již bylo demonstrováno transplantací zárodečných buněk mezi lososem atlantským a pstruhem duhovým (Hattori a kol., 2019).

2. CÍL

Cílem prezentované technologie bylo popsat a ověřit alternativní postup pro triploidizaci v akvakultuře, který využívá různých metod transplantace tetraploidních zárodečných kmenových buněk do diploidních recipientů, za účelem produkce diploidních spermií pro účely přímé triploidizace. Postup byl testován na dániu pruhovaném (*Danio rerio*). U tohoto druhu není možné produkovat životaschopné tetraploidní jedince (Herbst, 2002). To z dánie pruhovaného činí ideální organizmus pro demonstrování proveditelnosti metody produkce diploidních gamet u jinak neživotaschopných ryb.

Popsaný postup zahrnuje: 1) indukci tetraploidie u cílového druhu, 2) izolaci tetraploidních zárodečných kmenových buněk (z jinak neživotaschopných tetraploidních jedinců), 3) jejich transplantaci do náhradních sterilních, vysoce životaschopných rodičů a 4) reprodukci náhradních rodičů s kontrolními jedinci za účelem produkce triploidů.

3. MÍSTO OVĚŘENÍ TECHNOLOGIE

Předložená technologie popisuje postup, který byl ověřován na Genetickém rybářském centru Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity ve Vodňanech v Laboratoři zárodečných buněk v letech 2017–2019.

4. POPIS TECHNOLOGIE A VÝSLEDKY

4.1. Generační ryby

Použité linie dánia pruhovaného byly získány z Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně (AB linie), transgenní linie dánia pruhovaného exprimující zelený fluorescenční protein (GFP) pod kontrolou *vasa* (*ddx4*) genu (exprimován pouze v zárodečných buňkách), byla zakoupena od Universitě de Liège, Belgie. Jedinci dánia duhového (*Danio albolineatus*) použití pro produkci sterilních hybridů byli zakoupeni od lokálního chovatele. Ryby byly drženy v recirkulačním systému, kde byla udržována konstantní teplota 28,5 °C, pH 6,5–7, vodivost ~1 000 μS, fotoperioda 14 : 10 (D : N) (Obr. 2). Ryby byly 2–3x denně krmeny *ad libitum* suchou dietou formulovanou speciálně pro daný druh a 1x denně naupliemi *Artemia* sp.

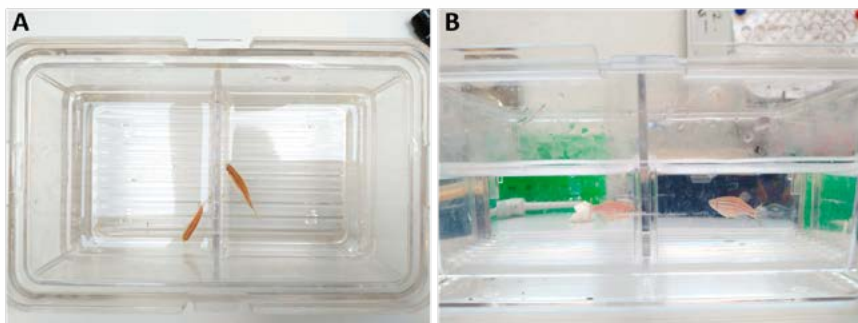


Obr. 2. Recirkulační systém pro chov dánií (Foto: R. Franěk).

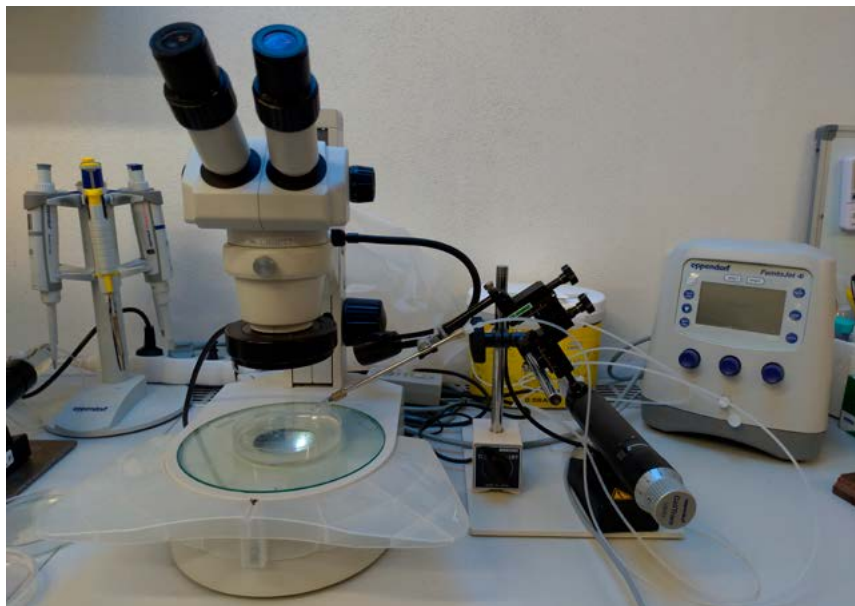
METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

4.2. Umělá reprodukce recipientů

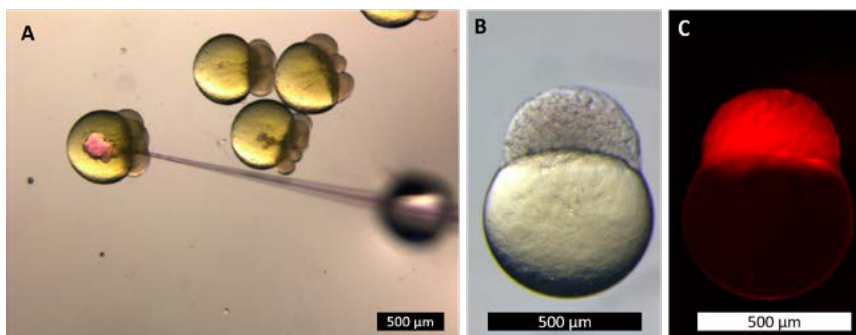
Pohlavně dospělí netransgenní jedinci (vždy jeden samec a jedna samice) byli den před výtěrem umístěni do vytíracích komůrek o objemu 0,7 l vybavených roštem a dělicí přepážkou (Obr. 3). V den výtěru po začátku světelné části fotoperiody byla odstraněna bariéra a ryby byly pozorovány s cílem selektovat samice, které ovulují jikry, aby nedocházelo ke zbytečné manipulaci s neovulujícími samicemi. Přirozeně oplozené jikry byly odebrány a neprodleně injikovány (Obr. 4) antisense morholino oligonukleotidem (AMO) tlumící expresi *dead end* genu (gen zodpovědný za migraci primordiálních zárodečných buněk) za účelem sterilizace embryí. Pro kontrolu úspěšné injikace byla přimíchána fluorescenční barva rhodamin dextran ve finální koncentraci 1 % (Obr. 5). Sterilní kříženci mezi samicemi dánia pruhovaného a samci dánia duhového byli produkováni umělým oplozením (Wong a kol., 2011). Samci dánia duhového byli uspáni v 0,05% roztoku MS222, močopohlavní papila byla osušena kapesníkem a spermie byly odebrány po jemné masáži břišní dutiny do mikropipety. Odebrané sperma bylo krátkodobě uchováno v imobilizačním roztoku Kurokura 180 (1,052 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,2 g CaCl₂ 2H₂O; 0,2 g NaHCO₃ rozpuštěném ve 100 ml destilované vody). Ovulující samice dánia pruhovaného byly taktéž uspány v 0,05% roztoku MS222, tělo bylo mírně osušeno a jikry byly získány mírnou masáží břišních partií (Obr. 6). Získané jikry (Obr. 7) byly jemně promíchány s odebraným spermatem, které bylo aktivováno přidáním odstáté vody o teplotě 28,5 °C. Embrya dánia pruhovaného ošetřená AMO a hybridní embrya byla držena do rozplavání (5. den po oplození) a následně byla krmena kulturou velký *ad libitum*.



Obr. 3. Vytírací box pro reprodukci dánia pruhovaného vybavený přepážkou a vkládacím roštem zabraňující konzumaci vytřených jiker. A) Horní pohled, samec vlevo, samice vpravo. B) Čelní pohled na vytírací box, samec vlevo, samice vpravo (Foto: R. Franěk).

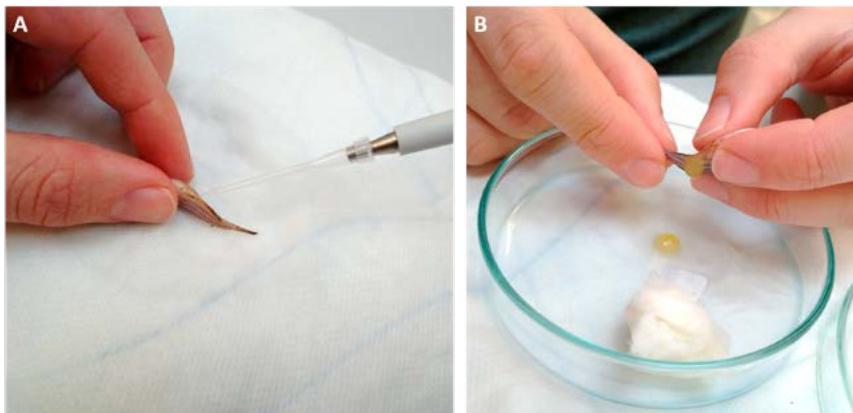


Obr. 4. Stereomikroskop s mikromanipulátorem a injektorem pro práci s embryi – mikroinjikace a transplantace buněk (Foto: R. Franěk).



Obr. 5. Sterilizace embryí dávnia pruhořáno pomocí mikroinjikace antisense morholino oligonukleotidu proti dead end genu. A) Injikace mikrokapiřarou do embrya ve stadiu 4 buněk. B, C) detekce úspěšně mikroinjikace založeně na pozorování pozitivního fluorescenčního signálu na DsRed kanálu (tekutina injikovaná do žloutku byla úspěšně transportována to animálního pólu) (Foto: R. Franěk).

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE



Obr. 6. Odběr gamet dánia pruhovaného pro *in vitro* oplodnění. A) Odběr spermií pomocí mikrokapiláry. B) Odběr jiker na Petriho misku (Foto: M. Pšenička).

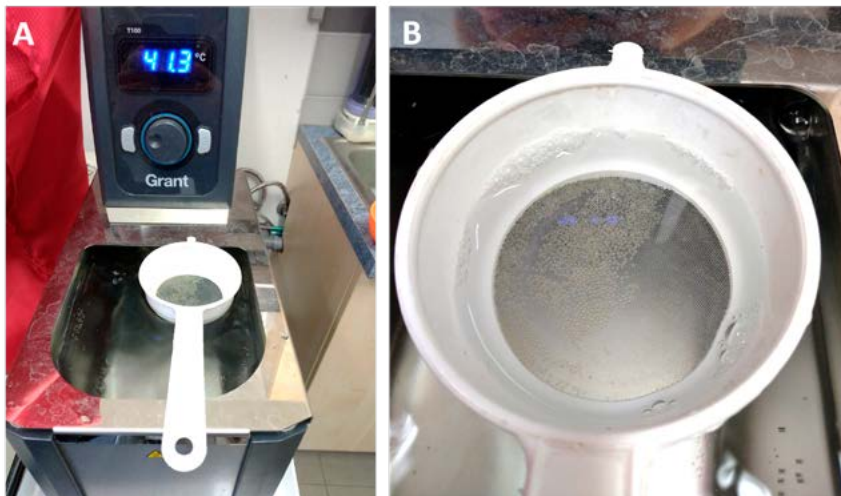


Obr. 7. Odebrané oocyty z několika samic dánia pruhovaného (cca 2 000 jiker) na Petriho misce s navlhčeným kapesníkem proti zabránění jejich vyschnutí při krátkodobém uchování (Foto: R. Franěk).

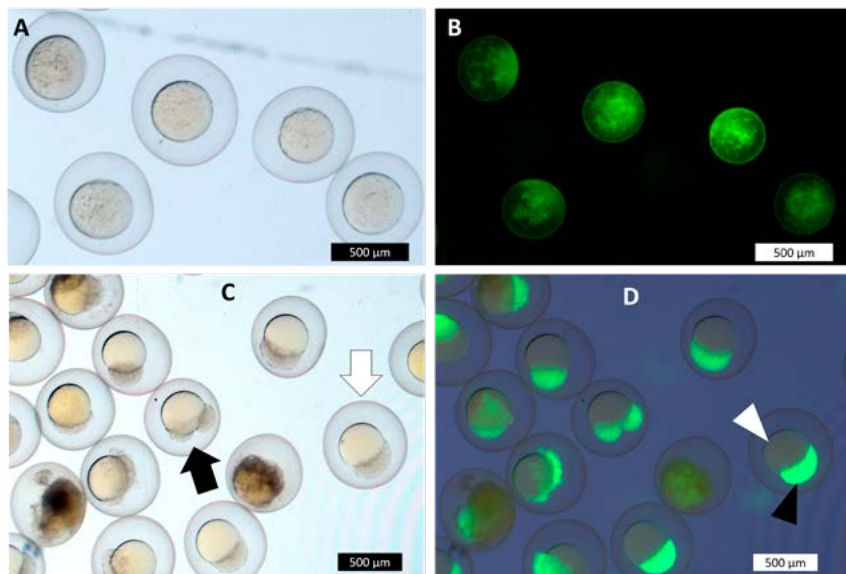
4.3. Indukce tetraploidie

Pro indukci tetraploidie byly gamety získány z transgenní linie obdobným způsobem, jako je uvedeno výše pro produkci sterilních hybridů. Po smísení gamet byly spermie aktivovány vodou o teplotě 28,5 °C a umístěny do temperovaného inkubátoru pro udržení teploty. Tetraploidie byla indukována teplotním šokem v cirkulující vodní lázni vybavené termostatem, použitá teplota lázně byla $41,2 \pm 0,1$ °C (Obr. 8). Pro optimalizaci indukce tetraploidie byly testovány šoky v rozmezí 13–20 minut po oplození, vždy po dobu 2 min. Teplotní šokem ošetřená embrya (Obr. 9) byla 24 h po oplození analyzována průtokovou cytometrií. Jednotlivá embrya byla umístěna do 1,5ml mikrozkrumavek a homogenizována po přidání pufru. Suspenze byla následně filtrována přes 30 μ m filtr a barvena roztokem 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI) a následně měřena oproti diploidní kontrole na průtokovém cytometru. S ohledem na již známou nežitvatšchopnost uměle indukovaných tetraploidů dánia pruhovaného (Herbst, 2002) a skutečnost, že transplantace byly prováděny ze stadia blastuly (3–4 h po oplození) či v průběhu somitogeneze (20–24 h po oplození při vývoji v 24 °C), nebylo pro určení optimálního šokového protokolu analyzováno přežití. Stadium blastuly je schopna dosáhnout obvykle nadpoloviční většina embryí ošetřených šokem (z jedné samice lze řádově získat několik stovek jiker), tudíž se nejedná o limitující faktor. V případě transplantace jednotlivých primordiálních gonocytů je nutné předpokládat již významnou mortalitu, nicméně jedno embryo donora má obvykle desítky primordiálních gonocytů, tudíž i několik jedinců je postačujících pro provedení transplantace. Cílem optimalizace protokolu pro teplotní šok bylo pouze dosáhnout co nejvyššího podílu tetraploidů. Na základě toho bylo identifikováno, že teplotní šok aplikovaný 18 min po oplození byl nejefektivnější, kdy následná analýza průtokovou cytometrií ukázala nadpoloviční (až 100% u jednotlivých samic) podíl tetraploidů u přeživších embryí (Obr. 10).

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

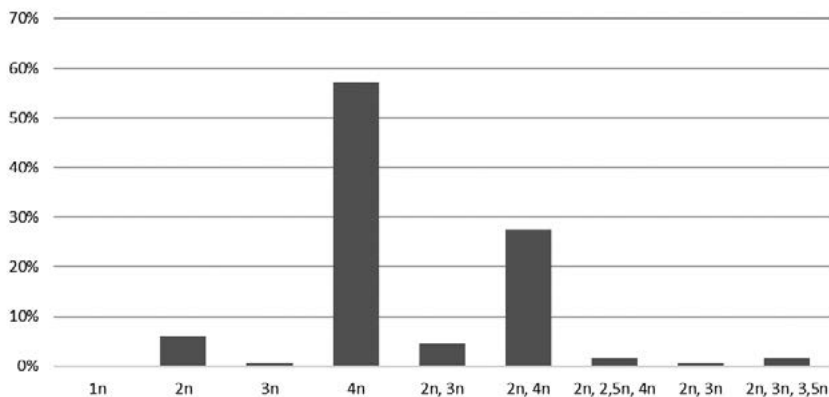


Obr. 8. Administrace teplotního šoku pro indukci tetraploidie. A) Teplotní šok je proveden v recirkulující lázni s termostatem. B) Embrya jsou umístěna do síta, což umožňuje snadnou manipulaci a rovnoměrnou expozici embryí v temperované lázni (Foto: R. Franěk).



Obr. 9. Vývoj embryí před a po teplotním šoku. A) Embrya 1–2 min po oplození, s nabobtnalým chorionem ale ještě bez vytvořeného animálního pólu (první buňky), snímek ze světlého pole. B) Embrya ze snímku A z použité transgenní linie exprimující zelený fluorescenční protein. Zelený fluorescenční signál je volně rozptýlen ve žloutku/cytoplazmě. Snímek pořízen s fluorescenčním filtrem GFP. C) Embrya po teplotním šoku za účelem indukce tetraploidie, černá šipka označuje embryo s defektním vývojem (rozdělený animální pól), bílá šipka označuje normálně vyvíjejícího se embryo, snímek pořízen ve světlém poli. D) Embrya ze snímku C zachycená s fluorescenčním filtrem GFP. Bílý trojúhelník označuje vegetativní pól (žloutek), ze kterého byl veškerý GFP signál mobilizován do animálního pólu označeného černým trojúhelníkem (Foto: R. Franěk).

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE



Obr. 10. Souhrnné výsledky měření ploidie u 262ks embryí dáňia pruhovaného, u kterých byl aplikován teplotní šok 18 min po oplození, po dobu 2 min při teplotě $41,2 \pm 0,1$ °C.

4.4. Transplantace zárodečných kmenových buněk

Tetraploidní jedinci produkovaní optimalizovaným protokolem pro teplotní šok byli testováni jako donoři zárodečných kmenových buněk pro tři různé metody transplantace a dva druhy recipientů. Pro manipulaci s embryi byly použity následující roztoky:

Ringerův roztok pro dechorionaci

- 0,1 g trypsinu rozpustit v:
100 ml Ringerova roztoku
 - 0,748 g NaCl
 - 0,02 G KCl
 - 0,026 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,024 g $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{S}$ (TAPS)
 - Doplnit objem na 100 ml destilovanou vodou
 - Pomocí 1M NaOH upravit pH na 8,3

Ringerův roztok pro manipulaci s embryi

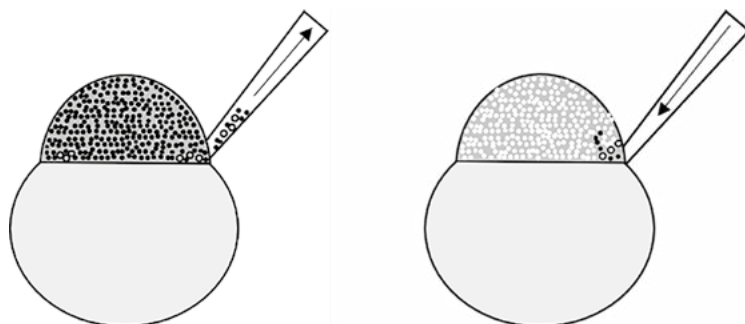
- 1,6 ml vaječného bílku rozpustit do:
100 ml Ringerova roztoku
 - 0,748 g NaCl
 - 0,02 G KCl
 - 0,026 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,024 g $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (HEPES)

- Doplnit objem na 100 ml destilovanou vodou
- Pomocí 1M NaOH upravit pH na 7,3

Pozn. Oba Ringerova roztoky (bez trypsinu či vaječného bílku) lze připravit 10x koncentrované, autoklávat a uchovat v chladu (+4 °C) po dobu několika týdnů až měsíců.

4.4.1. Transplantace blastomer

Tato metoda byla provedena dle Lin a kol. (1992) či Saito a kol. (2010). Pro transplantaci blastomer byla připravena sterilní embrya dáncia pruhovaného a hybridů tak, aby byli ve stejném vývojovém stadiu jako donoři (blastula = cca 1 000 buněk). Embrya recipientů a donorů byla dechorionována v 0,1% roztoku trypsinu v Ringerově roztoku pufrovaném na pH 8,3. Po narušení chorionu byla embrya 3x šetrně promyta Ringerovým roztokem pufrovaném na pH 7,3 s přidavkem 1,6 % vaječného bílku (pro inaktivaci trypsinu), aby došlo k uvolnění embryí z jikrných obalů. Transplantace blastomer byla provedena pod binokulární lupou pomocí mikromanipulátoru a mikroinjektoru. Blastomery z předpokládaného tetraploidního embrya byly odebrány v místě spodního okraje blastodisku a následně transplantovány do recipienta do přibližně stejného místa (Obr. 11). Obvykle bylo transplantováno 50–100 blastomer do jednoho recipienta. Transplantované chiméry zárodečné linie (organizmus mající v těle zárodečné buňky jiného jedince) byly prvních 24 h po transplantaci drženy v Ringerově roztoku, druhý den byly přemístěny do 5x ředěného Ringerova roztoku, od třetího dne byly drženy v odstáté vodovodní vodě. Přežití a úspěšnost transplantace byly průběžně monitorovány.

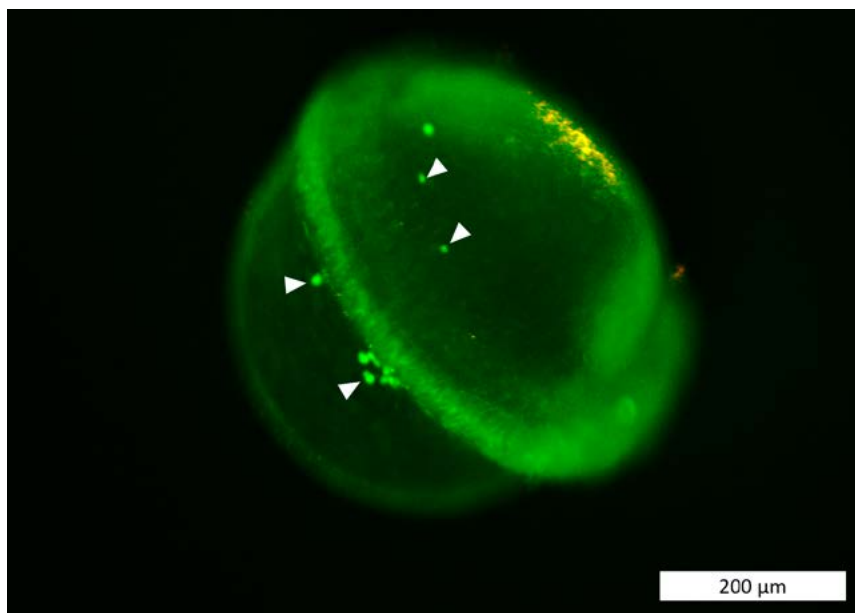


Obr. 11. Schématické znázornění postupu pro transplantaci blastomer. Blastomery donora (vlevo) jsou nasáty ze spodního okraje blastodisku do kapiláry a následně jsou transplantovány do přibližně stejného místa v recipientově (vpravo) blastule (Převzato a upraveno z Franěk, 2019).

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

4.4.2. Transplantace jednotlivých primordiálních gonocytů

Druhým způsobem transplantace byl transfer jednotlivých primordiálních gonocytů z tetraploidních embryí 24 h po oplození (Obr. 12) do recipientů ve stadiu blastuly, jak již bylo popsáno v Saito a kol. (2008, 2010). Podobně jako v předchozím způsobu byla embrya donorů a recipientů dechorionována. Transplantace byla provedena pod fluorescenčním stereomikroskopem s využitím manuálního manipulátoru a mikroinjektoru. Jednotlivé primordiální gonocyty byly vypreparovány z těl embryí a nasáty do skleněné mikrokapiláry, následně byly transplantovány do spodního okraje blastodisku (1–4 primordiální gonocyty). Chiméry zárodečné linie byly následně drženy a ošetřovány stejným způsobem, jako je uvedeno u transplantace blastomer.

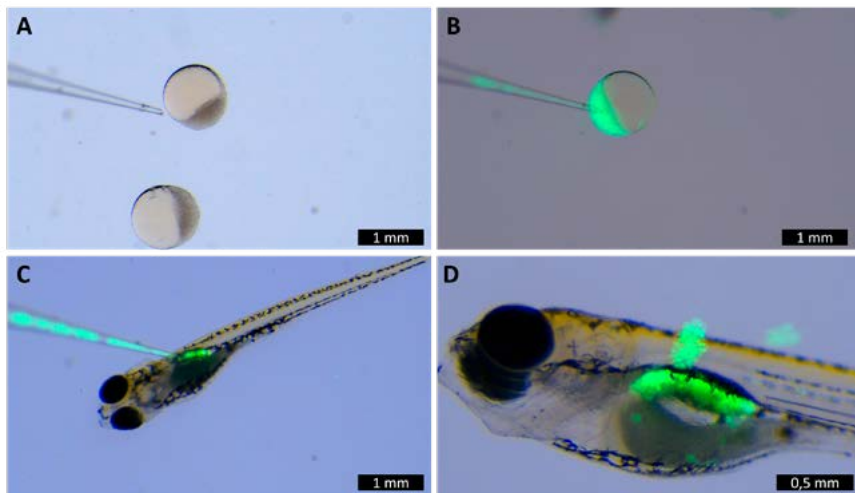


Obr. 12. Embryo v optimálním stadiu (10–12 somitů) pro transplantaci jednotlivých primordiálních gonocytů (označené bílými trojúhelníky) (Foto: R. Franěk).

4.4.3. Intraperitoneální transplantace blastomer

Třetím způsobem transplantace byla nová metoda, která byla vyvinuta právě na základě nízké úspěšnosti transplantace blastomer a technicky náročnému způsobu pro transplantaci jednotlivých primordiálních gonocytů. Předpokládaná

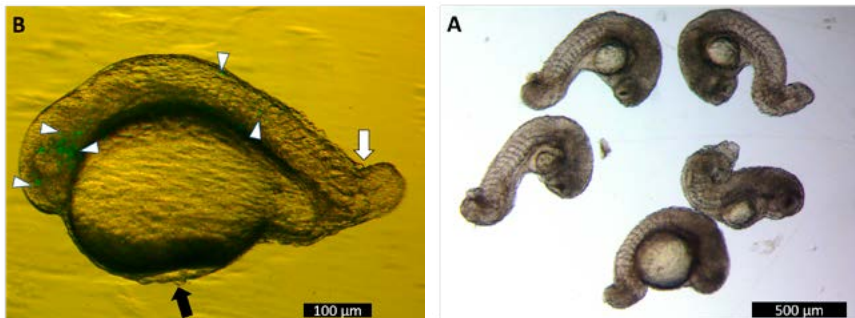
tetraploidní embrya donorů byla dechorionována a buňky blastuly byly nasáty do kapiláry. Buňky byly transplantovány do tělní dutiny recipientů ve stáří 7 dní (Obr. 13). Obvykle byly buňky z jednoho donora rozděleny do 2–3 recipientů. Chiméry zárodečné linie byly následně drženy a ošetřovány stejným způsobem, jako je uvedeno u transplantace blastomer.



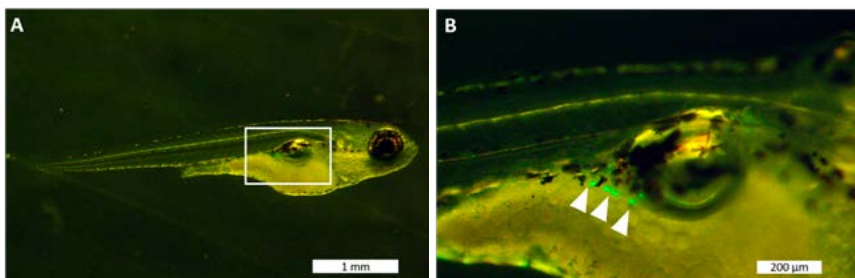
Obr. 13. Intraperitoneální transplantace ze stadia blastuly do rozplavaných recipientů. A) Dechorionovaná embrya donora, snímek ze světlého pole. B) Nasátí blastomer donora do kapiláry. C) Transplantace blastomer do tělní dutiny recipienta. D) Detail na transplantované blastomery v tělní dutině recipienta. Snímky B–C byly pořízeny s využitím fluorescence a filtru DA/FI/TR (Foto: R. Franěk).

Po transplantaci zárodečných buněk bylo dosaženo různé úspěšnosti indukce chimér zárodečné linie (jedinci s potvrzenou přítomností transplantovaných zárodečných buněk). V případě transplantace blastomer do recipienta ve stadiu blastuly byla úspěšnost nejnižší, což bylo zapříčiněno především tím, že celá manipulace byla prováděna ve velmi senzitivním stadiu vývoje. To bylo dále komplikováno předchozí sterilizací a přítomností v zásadě neživotaschopných tetraploidních blastomer, které jsou transplantovány do blastuly recipienta a účastní se vedle vývoje gamet také vývoje tělních buněk. Výsledkem je tedy jedinec, který může mít tetraploidní primordiální gonocyty, ale zároveň dochází k tomu, že tetraploidní somatické buňky narušují celkový vývoj a tito jedinci byli z dlouhodobého hlediska neživotní (Obr. 14).

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE



Obr. 14. Defektní vývoj recipientů po transplantaci blastomer. A) Typické malformace spojené s transplantací buněk. B) Malformovaná chiméra, bílé trojúhelníky značí transplantované buňky (zelený signál), které se nachází v hlavové oblasti a okolí oka. Bílá šipka označuje počínající deformaci ocasní části. Černá šipka značí vznikající edém žlutkového váčku. Zachycené deformace jsou letální (Foto: R. Franěk).



Obr. 15. Výsledek úspěšné transplantace primordiálních gonocytů do hybridního recipienta ve stadiu blastuly. A) Recipient 12 dní po oplození, bílý obdélník označuje detailní záběr. B) Detail na primordiální gonocyty (označené bílými trojúhelníky), které se nacházejí v korektní pozici genitální rýhy (Foto: R. Franěk).

Transplantace jednotlivých primordiálních gonocytů byla úspěšnější z hlediska přežití recipientů, jelikož při tomto způsobu transplantace nedochází k přenosu a začlenění tetraploidních somatických buněk do těla (Obr. 15). Přítomny jsou pouze tetraploidní primordiální gonocyty, kdy lze předpokládat, že jejich přítomnost nemá negativní vliv na životaschopnost chimér zárodečné linie. Nicméně i přesto dochází k defektnímu vývoji z důvodu manipulace během senzitivního stadia vývoje. Navíc je nutné zmínit vysokou náročnost této metody pro provádějící personál, ale i nízkou produktivitu, kdy lze v rozmezí optimálního stadia recipienta (1 000–4 000 buněk) vyprodukovat maximálně 50 chimér zárodečné linie. Zároveň je nutná vybavenost fluorescenčním

mikroskopem. Tato metoda je jasně znevýhodněna nutností vizualizace primordiálních gonocytů, kdy je nutné použít transgenní linie, což by následně vneslo komplikace do tržního uplatnění takto produkovaných triploidů. Případně je možné primordiální gonocyty krátkodobě značit pomocí uměle vyrobené mRNA. I přes tyto komplikace bylo dosaženo produkce dospělých a plodných chimér u obou testovaných typů recipientů.

Tab. 1. Výsledky úspěšnosti různých transplantačních metod na indukci chimér zárodečné linie.

| Metoda trans-plantace | Recipient | Opakování | Trans-plantováno (ks) | Přežití (%) | | | Produkce gamet (%) |
|-----------------------|-----------------|-----------|-----------------------|-------------|-------|-----------|--------------------|
| | | | | 24 hpt | 7 dpt | dospělost | |
| BT | Dáňio pruhované | I. | 61 | 62,3 | 18,0 | 13,1 | 4,9 |
| | | II. | 52 | 50,0 | 15,4 | 11,5 | 3,8 |
| | | III. | 84 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Hybrid | I. | 40 | 37,5 | 17,5 | 10 | 0 |
| | | II. | 61 | 16,4 | 6,6 | 3,3 | 0 |
| | | III. | 32 | 65,6 | 31,3 | 21,9 | 0 |
| PGC | Dáňio pruhované | I. | 32 | 37,5 | 12,5 | 0,0 | 0 |
| | | II. | 24 | 41,7 | 20,8 | 8,3 | 4,2 |
| | | I. | 21 | 66,7 | 47,6 | 28,6 | 9,5 |
| | Hybrid | II. | 19 | 57,9 | 31,6 | 21,1 | 10,5 |
| | | III. | 36 | 58,3 | 0 | 0 | 0 |
| | | I. | 42 | 95,2 | 81 | 66,7 | 7,1 |
| IP BT | Dáňio pruhované | II. | 44 | 97,7 | 68,2 | 50,0 | 11,4 |
| | | I. | 28 | 71,4 | 35,7 | 14,3 | 0 |
| | Hybrid | I. | 28 | 71,4 | 35,7 | 14,3 | 0 |
| | | II. | 40 | 82,5 | 47,5 | 30 | 0 |

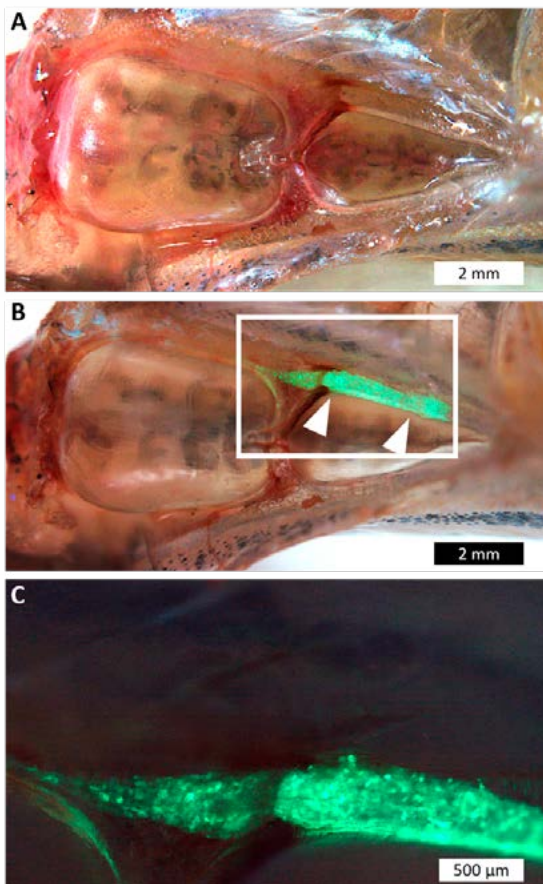
Pozn.: BT – transplantace blastomer, PGC – transplantace jednotlivých primordiálních gonocytů, IP BT – intraperitoneální transplantace blastomer, 24 hpt – 24 hodin po transplantaci, 7 dpt – 7 dní po transplantaci.

Poslední způsob transplantace byl zdaleka nejefektivnější, kdy bylo dosahováno srovnatelného přežití s kontrolními jedinci. Tento jev byl pravděpodobně dán tím, že tetraploidní buňky byly transplantovány do robustnějších jedinců, kteří již přešli na exogenní výživu a dobře snášeli i anestezii nutnou pro jejich imobilizaci. Navíc tato metoda nevyžaduje vizualizaci transplantovaných buněk, jelikož je provedena jako neselektivní transplantace. Z hlediska komplikací je nutné zmínit, že metoda měla velice nízkou efektivitu indukce chimér u hybridních recipientů, což bylo pravděpodobně zapříčiněno imunitní reakcí na transplantované buňky dáňia pruhovaného. Nicméně v současné době je možné využít několik dostupných způsobů pro sterilizaci recipientů a obecně lze předpokládat, že alogenní transplantace (u stejného

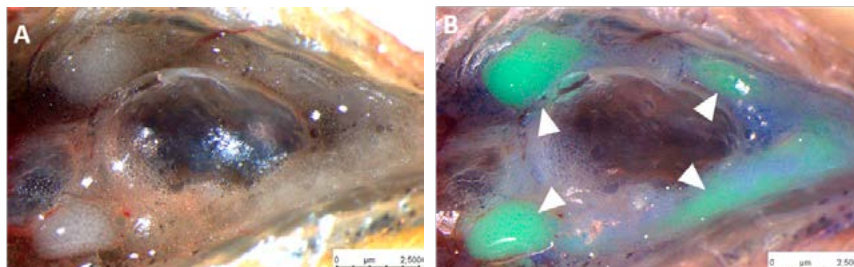
METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

druhu) bude mít vyšší efektivitu než transplantace xenogenní (mezidruhov^á transplantace) právě z důvodu vlivu imunokompatibility.

V případě použití sterilních recipientů dána pruhovaného se podařilo odchovat dostatečné množství chimér s vyvíjejícími se gonádami pro následnou reprodukci (Obr. 16 a 17).



Obr. 16. Vývoj gonád po intraperitoneální transplantaci blastomer. A) Otevřená tělní dutina sterilizovaného jedince dána pruhovaného ve věku 2 měsíců, snímek ze světlého pole. B) Fluorescenční snímek s využitím filtru DA/FI/TR, díky kterému je možné detekovat pozitivní signál z kolonizované části gonády (označeno bílými trojúhelníky) na základě exprese zeleného fluorescenčního proteinu. Bílý obdélník značí detailní záběr na část kolonizované gonády C) (Foto: R. Franěk).

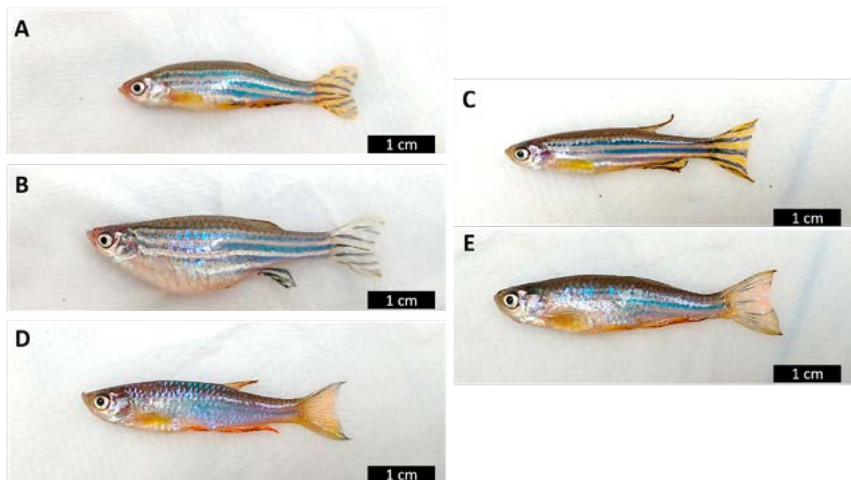


Obr. 17. Vývoj testes dospělého jedince dáncia pruhovaného po intraperitoneální transplantaci blastomer. A) otevřená tělní dutina 5 měsíců starého jedince, snímek světlého pole. B) Snímek jedince z obrázku A pořízený na fluorescenčním kanálu s využitím filtru DA/FI/TR pro detekci kolonizované části gonády (označeno bílými trojúhelníky) (Foto: R. Franěk).

4.5. Reprodukce chimér zárodečné linie

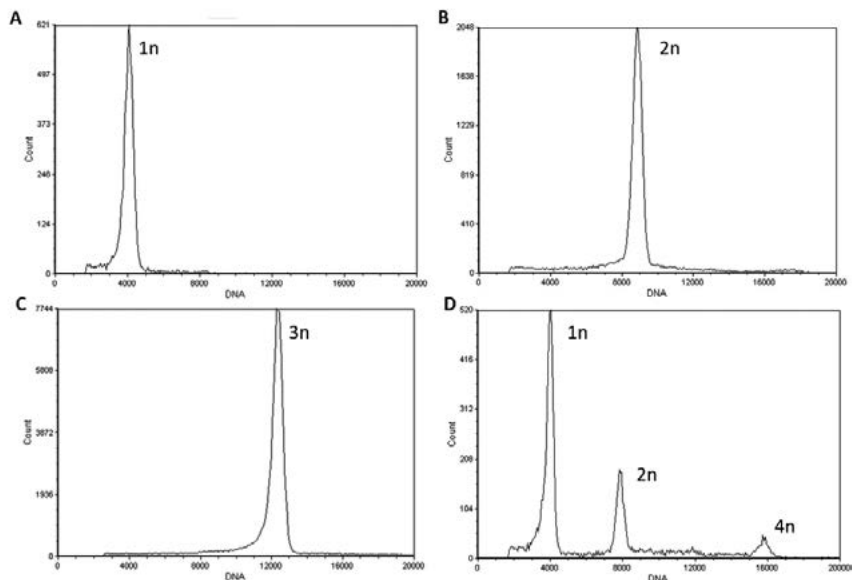
Přeživší jedinci po transplantaci byli do věku 10–12 dní krmeni trepkou velkou a do 1 měsíce věku naupliemi *Artemia* sp. Poté byly ryby přesunuty do chovného systému a krmeny suchou dietou. Po dosažení pohlavní dospělosti (3–6 měsíců) byli jedinci reprodukováni *in vitro*. V případě sterilních recipientů dáncia pruhovaného se všechny chiméry zárodečné linie vyvinuly ve fenotypové samce (Obr. 17). Tento jev je zapříčiněn pohlavní determinací dáncia pruhovaného, která je mimo jiné silně ovlivněna počtem primordiálních gonocytů. Při jejich depleci se ryby vyvíjejí ve fenotypové samce (Slanchev a kol., 2005; Liew a Orbán, 2014; Tzung a kol., 2015). V případě hybridních recipientů se vyvinulo několik ryb se samičími znaky, nicméně u žádné z chimér nebylo dosaženo ovulace oocytů ani po opakovaných pokusech o reprodukci. V tomto případě předpokládáme, že tento jev je obecně zapříčiněn skutečností, že oogeneze je násobně složitější proces než spermatogeneze a není kompatibilní s uměle indukovanými tetraploidními gonocyty, které nejsou schopny podstoupit gametogenezi.

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE



Obr. 18. Ilustrační snímky použitých jedinců pro reprodukci a jejich potomstva. A) Samec dánia pruhovaného. B) Samice dánia pruhovaného. C) Samčí jedinec, který byl sterilizován. D) Samec dánia duhového. E) Hybridní potomek samice dánia pruhovaného a samce dánia duhového, který je sterilní (Foto: R. Franěk).

Pro ověření ploidie gamet chimér zárodečné linie byli jedinci anestetizováni v 0,05% roztoku MS222 (tricain methansulfonát), močopohlavní papila byla jemně osušena a po stlačení břišní partie byly spermie odebrány mikropipetou do imobilizačního roztoku Kurokura 180. Spermie byly odebrány individuálně od každého samce. Pod světelným mikroskopem vybaveným fázovým kontrastem byla prvotně hodnocena přítomnost spermií a možnost jejich aktivace vodou. Vzorky motilních spermií byly následně použity pro oplození normálních (haploidních) oocytů. Ty byly získány z ovulujících samic dánia pruhovaného, které byly připraveny k reprodukci stejným způsobem, jako je popsáno v bodu 4.2. Oocyty získané z 3–6 samic byly rozděleny na přibližně stejné díly a individuálně oplozeny spermii získanými z chimér. Vývoj embryí byl průběžně monitorován a následně byla ověřena jejich ploidie pomocí průtokové cytometrie popsané v bodu 4.3, kdy byla potvrzena přítomnost triploidních jedinců. Pro potvrzení produkce diploidních spermií a vyloučení možnosti, že potomstvo vzniklo spontánní triploidizací, byly znovu odebrány spermie od selektovaných samců chimér, které byly následně analyzovány průtokovou cytometrií oproti kontrolním haploidním spermii. V případě spermií získaných z chimér zárodečné linie byl relativní obsah DNA přibližně dvojnásobný oproti kontrole (Obr. 19), což potvrzuje možnost produkce diploidních spermií prostřednictvím náhradní reprodukce pro účely přímé triploidizace.



Obř. 19. Ověření ploidy u experimentálních ryb pomocí měření relativního obsahu DNA v buňkách průtokovou cytometrií. A) Kontrolní vzorek haploidních spermií. B) Kontrolní vzorek diploidní larvy. C) Triploidní jedinec vzniklý křížením haploidního oocytu a diploidních spermií získaných z chimér zárodečné linie. D) Kontrolní směsný vzorek haploidních spermií (1n), kontrolního diploidního embrya (2n) a tetraploidního embrya po teplotním šoku (4n).

5. EKONOMICKÝ PŘÍNOS

Cílem technologie byl popis produkce diploidních gamet prostřednictvím náhradních rodičů. Touto cestou lze zavést produkci triploidních ryb i na pracoviště, která nemají dostatečnou zkušenost či vybavení pro aplikaci šokových ošetření. S ohledem na vyčíslení ekonomického přínosu lze odhadnout že, využití popsané technologie může v počátcích znamenat úsporu v řádu desetitisíců korun. Nejzásadnějším přínosem předkládané technologie je ten, že pro účely triploidizace není nutné dalších zásahů do embryonálního vývoje, tudíž předpokládáme stabilnější výsledky v produkci triploidů. Zároveň věříme, že tuto technologii lze aplikovat u druhů ryb, kde jsou uměle indukovaní tetraploidi neživotní, a tudíž je nejde použít pro přímou produkci triploidů. Chiméry zárodečné linie mohou být opakovaně použity pro reprodukci, jelikož byly transplantovány zárodečné kmenové buňky, které mají schopnost sebeobnovení. Nicméně jsme si vědomi, že předkládaná technologie využívající

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

náhradního rodičovství prostřednictvím transplantace zárodečných kmenových buněk je náročná na expertizu provádějících pracovníků. Na druhou stranu předpokládáme značné urychlení procesu produkce triploidních ryb, jelikož je pouze potřeba smísit gamety chimér (v našem případě spermie) s normálními haploidními oocyty.

Díky použití triploidních jedinců v akvakultuře lze očekávat zlepšení ekonomického výsledku chovu, kdy energie krmiva je v porovnání s diploidními jedinci investována do vývoje gonád v menší míře.

6. UPLATNĚNÍ TECHNOLOGIE V PRAXI

Předložený postup byl aplikován ve spolupráci pracovníků Laboratoře zárodečných buněk Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a Veterinární a farmaceutické univerzity Brno pro produkci chimér zárodečné linie u jedinců dánia pruhovaného, které byly následně použity pro produkci triploidních jedinců pro účely toxikologických testů. Zároveň probíhá ověřování popsaného postupu u lína obecného (*Tinca tinca*), který bude moci být aplikován pro produkční akvakulturu za účelem produkce triploidních obsádek.

Díky již známé neživotnosti uměle indukovaných tetraploidních jedinců dánia pruhovaného, které bylo zvoleno jako model pro předkládanou technologii, bylo jasně prokázáno, že samotná neživotaschopnost je dána na úrovni organismu. Životaschopnost tetraploidních zárodečných buněk byla obnovena transplantací do plně životného diploidního recipienta, který poskytl vhodné prostředí pro gametogenezi a produkci diploidních spermií. Díky tomu si dovoluujeme tvrdit, že právě transplantací tetraploidních buněk lze „zachránit“ jejich životaschopnost, a tím pádem lze do budoucna předpokládat, že bude možné produkovat diploidní gamety u druhů ryb, kde uměle indukovaná tetraploidie není kompatibilní s životaschopností a dosažení pohlavní dospělosti s následnou produkcí diploidních gamet pro účely triploidizaci. Na základě experimentů můžeme identifikovat metodu intraperitoneální transplantace blastomer do rozplavaných recipientů jako nejvhodnější pro produkci diploidních gamet z hlediska dosahovaného přežití, které násobně překonává zbylé dvě testované metody. V případě transplantace blastomer či jednotlivých primordiálních gonocytů je jako recipient použito embryo ve stadiu blastuly, které je jedno z nejkritičtějších pro vývoj, kdy porušení integrity může mít za následek nedokončení gastrulace, což je vždy letální. Zároveň tato metoda nevyžaduje použití transgenních jedinců či jiná další značení buněk, tudíž je proveditelná s běžným vybavením pro mikromanipulaci a následné uvedení takto produkováných triploidů na trh je v souladu s legislativou ČR.

7. SEZNAM LITERATURY

- Arai, K., Fujimoto, T., 2013. Genomic constitution and atypical reproduction in polyploid and unisexual lineages of the *Misgurnus* loach, a teleost fish. *Cytogenetic and Genome Research* 140: 226–240.
- Arai, K., Matsubara, K., Suzuki, R., 1993. Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 117: 227–235.
- Bar, I., Smith, A., Bubner, E., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Yazawa, R., Chen, B.N., Cummins, S., Elizur, A., 2016. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) as a surrogate host for the production of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) seed via spermatogonial germ cell transplantation. *Reproduction, Fertility and Development* 28: 2051.
- Blanc, J.M., Chourrout, D., Krieg, F., 1987. Evaluation of juvenile rainbow trout survival and growth in half-sib families from diploid and tetraploid sires. *Aquaculture* 65: 215–220.
- Brinster, R.L., Zimmermann, J.W., 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11298–11302.
- Chourrout, D., Chevassus, B., Krieg, F., Happe, A., Burger, G., Renard, P., 1986. Production of second generation triploid and tetraploid rainbow trout by mating tetraploid males and diploid females? Potential of tetraploid fish. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 193–206.
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Feindel, N.J., Benfey, T.J., Trippel, E.A., 2010. Competitive spawning success and fertility of triploid male Atlantic cod *Gadus morhua*. *Aquaculture Environment Interactions* 1: 47–55.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111: 175–195.
- Flajšhans, M., Gela, D., Kocour, M., Buchtová, H., Rodina, M., Pšenička, M., Kašpar, V., Piačková, V., Sudová, E., Linhart, O., 2010. A review on the potential of triploid tench for aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20: 317–329.
- Flajšhans, M., Linhart, O., Kvasnička, P., 1993. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.): induced triploidy and tetraploidy and first performance data. *Aquaculture* 113: 301–312.
- Franěk, R., 2019. Germ cell manipulations as a tool to manage and produce isogenic lines in fish. Ph.D. thesis, USB FFPW, RIFCH, Vodňany, 164 pp.
- Franěk, R., Baloch, A.R., Kašpar, V., Saito, T., Fujimoto, T., Arai, K., Pšenička, M., 2019a. Isogenic lines in fish – a critical review. *Reviews in Aquaculture* 12: 1412–1434.

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

- Franěk, R., Tichopád, T., Fučíková, M., Steinbach, C., Pšenička, M., 2019b. Production and use of triploid zebrafish for surrogate reproduction. *Theriogenology* 140: 33–43.
- Franěk, R., Marinović, Z., Lujčić, J., Urbányi, B., Fučíková, M., Kašpar, V., Pšenička, M., Horváth, Á., 2019c. Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. *PLOS ONE* 14: e0205481.
- Franěk, R., Tichopád, T., Steinbach, C., Xie, X., Lujčić, J., Marinović, Z., Horváth, Á., Kašpar, V., Pšenička, M., Lujčić, J., Horváth, Á., Pšenička, M., 2019d. Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation. *Cryobiology* 87: 78–85.
- Hashimoto, Y., Maegawa, S., Nagai, T., Yamaha, E., Suzuki, H., Yasuda, K., Inoue, K., 2004. Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Developmental Biology* 268: 152–161.
- Hassan, A., Okomoda, V.T., Pradeep, P.J., 2018. Triploidy induction by electric shock in red hybrid tilapia. *Aquaculture* 495: 823–830.
- Hattori, R.S., Yoshinaga, T.T., Katayama, N., Hattori-Ihara, S., Tsukamoto, R.Y., Takahashi, N.S., Tabata, Y.A., 2019. Surrogate production of *Salmo salar* oocytes and sperm in triploid *Oncorhynchus mykiss* by germ cell transplantation technology. *Aquaculture* 506: 238–245.
- Herbst, E.C., 2002. Induction of tetraploidy zebrafish (*Danio rerio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). University of North Carolina at Charlotte, USA, 127 pp.
- Kawakami, Y., Saito, T., Fujimoto, T., Goto-Kazeto, R., Takahashi, E., Adachi, S., Arai, K., Yamaha, E., 2012. Technical note: Viability and motility of vitrified/thawed primordial germ cell isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) somite embryos. *Journal of Animal Science* 90: 495–500.
- Komen, H., Thorgaard, G.H., 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture* 269: 150–173.
- Kusuda, S., Teranishi, T., Koide, N., Nagai, T., Arai, K., Yamaha, E., 2004. Pluripotency of Cryopreserved Blastomeres of the Goldfish. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* 301: 131–138.
- Li, Y.J., Zhang, M.Z., Qian, C., Gao, M., Arai, K., 2012. Fertility and ploidy of gametes of diploid, triploid and tetraploid loaches, *Misgurnus anguillicaudatus*, in China. *Journal of Applied Ichthyology* 28: 900–905.
- Liew, W.C., Orbán, L., 2014. Zebrafish sex: a complicated affair. *Briefings in functional genomics* 13: 172–87. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt041>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 4519–4523.
- Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Mavrodiev, N., Nebesarova, J., Gela, D., Kocour, M., 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquaculture International* 14: 9–25.

- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165: 367–389.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Differentiation* 50: S195–217.
- Octavera, A., Yoshizaki, G., 2018. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in Chinese rosy bitterling. *Biology of Reproduction* 100: 1108–1117.
- Peruzzi, S., Kettunen, A., Primicerio, R., Kaurić, G., 2007. Thermal shock induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research* 38: 926–932.
- Piferer, F., Beaumont, A., Falguière, J.C., Flajšhans, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293: 125–156.
- Pšenička, M., Saito, T., Rodina, M., Dzyuba, B., 2016. Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells. *Cryobiology* 72: 199–122.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Arai, K., Yamaha, E., 2008. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biology of Reproduction* 78: 159–166.
- Saito, T., Goto-Kazeto, R., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., Yamaha, E., 2010. Interspecies transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *International Journal of Developmental Biology* 54: 1479–1484.
- Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Méndez, G., Raz, E., 2005. Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 4074–4079.
- Starz-Gaiano, M., Lehmann, R., 2001. Moving towards the next generation. *Mechanisms of Development* 105: 5–18.
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., Takeuchi, T., 2003. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of Reproduction* 69: 1142–1149.
- Taranger, G.L., Carrillo, M., Schulz, R.W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.A., Dufour, S., Karlsen, Ø., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T., 2010. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 483–515.
- Tiway, B.K., Kirubakaran, R., Ray, A.K., 2004. The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14: 391–402.
- Tzung, K.W., Goto, R., Saju, J.M., Sreenivasan, R., Saito, T., Arai, K., Yamaha, E., Hossain, M.S., Calvert, M.E.K., Orbán, L., 2015. Early depletion of primordial germ cells in zebrafish promotes testis formation. *Stem Cell Reports* 4: 61–73.
- Wang, S., Tang, C., Tao, M., Qin, Q., Zhang, C., Luo, K., Zhao, R., Wang, J., Ren, L., Xiao, J., Hu, F., Zhou, R., Duan, W., Liu, S., 2019. Establishment and application of distant hybridization technology in fish. *Science China Life Sciences* 62: 22–45.

METODY STABILNÍ PRODUKCE DIPLOIDNÍCH GAMET POMOCÍ NÁHRADNÍCH RODIČŮ PRO ÚČELY TRIPLOIDIZACE V AKVAKULTUŘE

- Wang, Y., Zhang, M., Tao, S., Xie, X., Tan, H., Cao, L., Wang, J., Qin, Q., Zhang, C., Tao, M., Ma, M., Chen, B., Liu, S., 2019. Unreduced diploid sperm from diploid hybrids and formation of a new type of tetraploid hybrid. *Aquaculture* 734584.
- Wong, T.-T., Saito, T., Crodian, J., Collodi, P., 2011. Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae. *Biology of Reproduction* 84: 1190–1197.
- Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Ishida, M., Yoshizaki, G., 2013. The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) dead end gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia. *Molecular Reproduction and Development* 80: 871–880.
- Yoshizaki, G., 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.
- Zhou, L., Gui, J., 2017. Natural and artificial polyploids in aquaculture. *Aquaculture and Fisheries* 2: 103–111.

Odborný externí oponent

Ing. Lukáš Vetešník, Ph.D.

Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i., Květná 8, 603 65 Brno, www.ivb.cz

Odborný interní oponent

Ing. Vojtěch Kašpar, Ph.D.

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

Ověření a uplatnění technologie v roce 2019

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1,

612 42 Brno-Královo Pole

Adresa autorského kolektivu

Ing. Roman Franěk, Ph.D. (60 %)

doc. Ing. Martin Pšenička, Ph.D. (40 %)

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

*V edici Metodik (Technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz
odborný editor: dr hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D.; redakce: Zuzana Dvořáková
náklad: 200 ks, 1. vydání, vytištěno v roce 2021, grafický design a technická realizace:
Jesenické nakladatelství Jena Šumperk*

