



Krzysztof Jagiełło, Konrad Ocalewicz

Zakład Biologii i Ekologii Morza, Wydział Oceanografii i Geografii, Uniwersytet Gdański

## Produkcja i wykorzystanie w akwakulturze homozygotycznych osobników i klonalnych linii ryb

### Wstęp

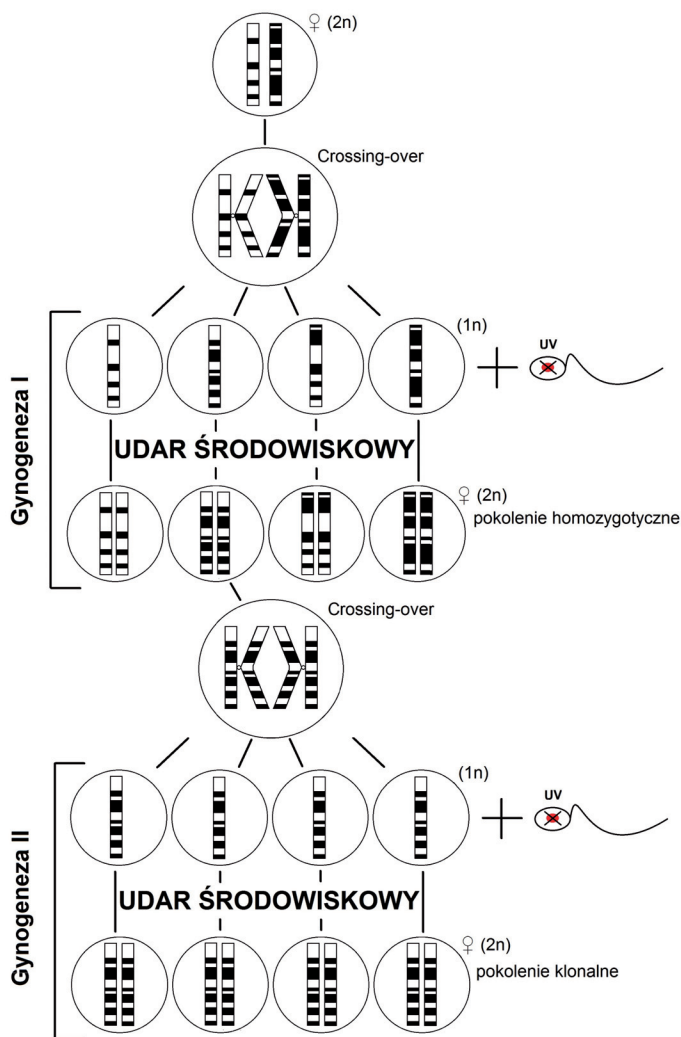
Ekonomiczne podejście, tak samo jak dbałość o naturalne środowisko prowadzi do zwiększenia zainteresowania hodowlą zwierząt jako stałego źródła pożywienia. Ryby, będące zasobem aktywnie eksploatowanym, są hodowane w warunkach akwakultury z coraz większą intensywnością. W akwakulturze zwiększanie wydajności hodowli ryb osiąga się w wyniku zastosowania różnorodnych technik i zabiegów. Rozród i podchów ryb w warunkach kontrolowanych oraz żywienie paszami komercyjnymi pozwala na uzyskanie osobników o wymaganych przez hodowców cechach. Skuteczna ochrona zdrowia oraz prowadzenie programów hodowlanych i selekcyjnych ma na celu uzyskanie produktów spełniających oczekiwania konsumentów. Sposobem otrzymywania pokolenia ryb o wyższych wartościach cech ilościowych, takich jak tempo wzrostu, masa ciała, większa odporność na choroby czy większa płodność, jest krzyżowanie ze sobą odmiennych od siebie homozygotycznych osobników. Jednym z programów hodowlanych umożliwiających wzrost produkcji w akwakulturze jest tworzenie i hodowanie jednopłciowych stad ryb. I tak w przypadku pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) coraz większą popularność zdobywa produkcja i hodowla wyłącznie samic (all female). Samice tego gatunku w przeciwieństwie do samców osiągają rozmiary konsumpcyjne przed uzyskaniem dojrzałości płciowej, dzięki czemu jakość ich tkanki mięśniowej nie obniża się. Ponadto w wyniku wieloletnich prac, udało się opracować metodę produkcji triploidalnych, bezpłodnych samic pstrąga tęczowego, których szczątkowe gonady nie są w stanie wyprodukować funkcjonalnych gamet. Dzięki temu ryby triploidalne rosną także w okresie, kiedy ich „normalne” rodzeństwo większość energii z pokarmu zużywa na rozwój gonad i produkcję gamet, przygotowując się tym samym do tarła.

Wyprodukowanie jednopłciowych stad ryb, podobnie jak tworzenie sterylnych osobników, jest możliwe dzięki rozwojowi technik z zakresu inżynierii genomowej, takich jak poliploidyzacja, gynogeneza czy androogeneza. Produkcja ryb posiadających zwiększoną liczbę chromosomów (poliploidyzacja) lub jądro DNA odziedziczony tylko po jednym z rodziców (androogeneza i gynogeneza) nie wzbudza kontrowersji, ponieważ według prawa polskiego nie są to organizmy modyfikowane genetycznie (GMO). Oprócz produkcji sterylnej i jednopłciowego materiału obsadowego, zabiegi gynogenezy i androogenezy pozwalają na produkcję homozygotycznych ryb, które można bezpośrednio wykorzystać w badaniach naukowych lub hodować dalej, w celu utworzenia wsobnych i klonalnych linii. Hodowla ryb o jednorodnym genomie stawia jednak wiele wyzwań przed producentami. Mimo tego w Polsce i na świecie są już miejsca, gdzie tego typu prace są prowadzone. Z upływem czasu mogą stać się one stałym elementem i głównym źródłem osobników, które zostałyby wykorzystane w badaniach naukowych, programach hodowlanych i selekcyjnych.

### Homozygotyczne osobniki i klonalne linie ryb – definicje i metody uzyskiwania

O **homozygotyczności** osobników świadczy jednorodność ich genomu, w którym wszystkie geny zawierają takie same allele, a gamety są jednakowe.

**Homozygotyczne linie ryb** składają się z osobników uzyskanych w wyniku manipulacji genomowych, takich jak gynogeneza mitotyczna albo androogeneza. Gamety heterozygotycznego osobnika rodzicielskiego różnią się, co jest konsekwencją zachodzącego w trakcie mejozy procesu crossing-over (rys. 1). Oznacza to, że osobniki uzyskane w wyniku indukcji gynogenezy mitotycznej lub androogenezy z wykorzystaniem komórek rozrodczych pochodzących od



Rys. 1. Produkcja homozygotycznych samic i wykorzystanie wytworzonych przez nie gamet w celu uzyskania klonalnego pokolenia ryb.

heterozygotycznych rodziców będą homozygotyczne, ale jako rodzeństwo wciąż wykazywać będą różnice między sobą (rys. 1) (Dunham 2004).

Metoda uzyskania **homozygotycznych osobników** wymaga wykorzystania technologii androgenozy i mitotycznej gynogenezy, w celu wyprodukowania osobników dziedziczących tylko ojcowskie lub tylko matczyne chromosomy. W obu przypadkach cały proces składa się z trzech etapów: (1) napromieniowywania gamet w celu genetycznej inaktywacji (degradacji) DNA jaj (androgenozy) i plemników (gynogenezy), (2) inseminacji i (3) podwojenia haploidalnego zestawu w androgenetycznych i gynogenetycznych zygotach poprzez zatrzymanie pierwszego podziału komórkowego. **Gynogeneza** polega na aktywacji jaj przez genetycznie inaktywowane za pomocą promieniowania UV plemniki (Chourrout 1986, Thorgaard 1986). Następnie, uzyskane w wyniku aktywacji jaj, haploidalne zygoty posiadające tylko matczyne chromosomy poddaje się działaniu udaru (szoku) środowiskowego lub chemicznego. Ekspozycja haploidalnych zygot na działanie subletalnej tempera-

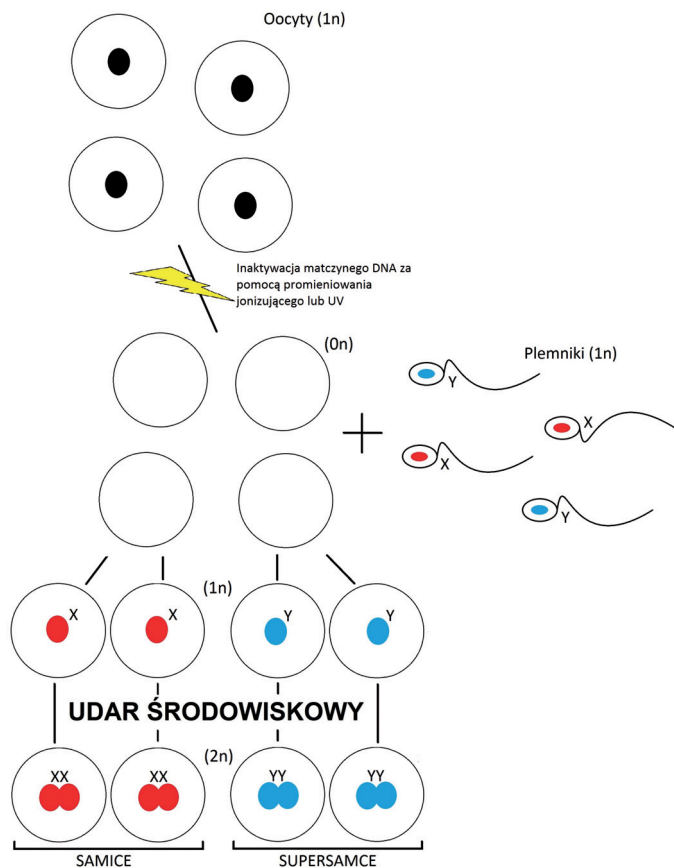
tury, wysokiego ciśnienia lub czynników chemicznych na początku (profaza) pierwszego podziału mitotycznego zygoty (gynogeneza mitotyczna) spowoduje, że matczyne chromosomy ulegną podwojeniu, a zygoty stają się diploidalne (rys.1). Osobniki, które rozwiną się z takich zygot nazywane są podwojonymi haploidami (DH, *doubled haploids*) i są homozygotyczne. Jeżeli haploidalne zygoty będziemy ekspozować na działanie udaru środowiskowego wcześniej, tuż po inseminacji, to nie dopuścimy do zakończenia podziału mejozy i do wyrzucenia drugiego ciała kierunkowego (gynogeneza mejozy). Tym samym uzyskamy gynogenetyczne diploidalne osobniki, jednak ze względu na pochodzenie drugiego zestawu chromosomów, będą one heterozygotami (Komen i Thorgaard 2007). Etap udaru środowiskowego jest pomijany wtedy, gdy organizm matczyny jest tetraploidalny, a produkowane przez niego oocyty są diploidalne (Liu i in. 2007).

Osobniki **androgenetyczne** posiadają jedynie ojcowski jądrowy materiał genetyczny. Uzyskuje się je poprzez inseminację napromieniowanych jaj nasieniem z nienaruszonym DNA i w późniejszym czasie duplikacją ojcowskich chromosomów poprzez zablokowanie pierwszego podziału mitotycznego, podobnie jak ma to miejsce w przypadku gynogenezy mitotycznej. Biorąc pod uwagę różnice w genomie plemników, połowa osobników potomnych będzie posiadała dwa chromosomy Y (super-samce), a druga połowa dwa chromosomy X (samice) (rys. 2). Skrzyżowanie „supersamca” (YY) z samicą o normalnym genotypie (XX) powinno skutkować uzyskaniem potomstwa składającego się wyłącznie z samców (XY).

Pomimo tego, że ryby wyhodowane za pomocą gynogenezy mitotycznej lub androgenozy są w pełni homozygotyczne, nie są klonami organizmów rodzicielskich (rys.1). **Klonalne linie ryb** mogą być wyhodowane w wyniku kolejnych rund androgenozy i gynogenezy, z wykorzystaniem gamet pochodzących od homozygotycznych gynogenetycznych lub androgenetycznych osobników (rys.1). Wykorzystując jaja pobrane od homozygotycznych gynogenetycznych lub androgenetycznych samic, w celu przeprowadzenia kolejnej gynogenezy, uzyskuje się jednorodną genetycznie linię ryb o genotypie identycznym z matczynym – linię klonalną (rys. 1). W przypadku posiadania gamet pochodzących od homozygotycznych samic, do tworzenia klonalnej linii wykorzystać można gynogenezę mejozy, której skuteczność jest zazwyczaj wyższa niż gynogenezy mitotycznej.

## Weryfikacja skuteczności gynogenezy i androgenozy ryb

Zastosowanie technik manipulacji genomowych wymaga użycia metod pozwalających potwierdzić ploidal-



Rys. 2. Indukcja procesu androgenozy u ryb.

ność oraz homozygotyczność badanych osobników. Ocenę ploidalności komórek można przeprowadzić wykorzystując cytometrię przepływową. Znakowanie komórek fluorochromami łączącymi się z DNA w jądrach komórek pozwala określić jego ilość, a tym samym oszacować ploidalność komórek. Szybką i skuteczną metodą pozwalającą na analizę objętości jąder w erytrocytach ryb jest mierzenie objętości komórek (ang. *Coulter counter*). Skuteczność szoku temperaturowego lub ciśnieniowego u danego gatunku można określić także dzięki analizie liczby chromosomów osobników uzyskanych w wyniku zabiegów androgenozy i gynogenez. Metafazowe chromosomy dla łatwiejszej ich analizy wybarwia się, na przykład odczynnikiem Giemsa lub barwnikami fluorescencyjnymi i bada pod mikroskopem w świetle białym lub UV. Określenie ploidalności ryb na podstawie liczby aktywnych jąder w jądrze komórkowym jest szybką metodą, pozwalającą na odróżnienie osobników diploidalnych od poliploidalnych. Analiza ta jednak nie pozwala na jednoznaczne odróżnienie ryb o różnym stopniu poliploidalności (Ocalewicz i in. 2006).

Metody molekularnego określania homozygotyczności osobników wymagają użycia wyspecjalizowanego sprzętu, co zwiększa ich koszt, ale pozwala na dokładną analizę osobników. Analiza mikrosatelitarnego DNA jest metodą, w której do analizy wykorzystuje się fragmenty DNA o dużej zmienności osobniczej. Krótkie, tandemowe powtórzenia

mikrosatelitarnego DNA, które poddaje się amplifikacji techniką PCR, stanowią element różnicujący osobniki. Nowszym rozwiązaniem jest zastosowanie metod sekwencjonowania genomu, które pozwalają na określenie dokładnej sekwencji jądrowego DNA. Sprawdzenie sekwencji DNA jest także możliwe dzięki zastosowaniu mikromacierzy, których wykorzystanie umożliwi szybką analizę dużych fragmentów genomu poprzez hybrydyzację z krótkimi sondami.

## Skuteczność zabiegów tworzenia homozygotycznych osobników i klonalnych linii ryb

Żywotność ryb uzyskanych metodami inżynierii genomowej zależna jest od wielu czynników, przy czym charakterystyczny jest niski procent przeżywających osobników. Podczas wykluwania się podwojonych haploidów, przeżywalność rzadko przekracza 10% (Michalik i in. 2014). Nieliczne z homozygotycznych androgenotów i gynogenotów dożywają do etapu dojrzewania płciowego. Według opublikowanych wcześniej prac homozygotyczne osobniki gynogenetyczne wykazują wyższą przeżywalność w porównaniu do androgenotów. Czynniki obniżające żywotność osobników androgenetycznych to tak jak w przypadku gynogenotów ujawnienie się letalnych alleli, ale także skutki uboczne zabiegów przeprowadzonych na jajach, a więc ekspozycja na duże dawki promieniowania jonizującego lub UV i udar środowiskowy (Ocalewicz i in. 2010). Naświetlanie oocytów oraz poddawanie ich szokowi temperaturowemu lub ciśnieniowemu może niszczyć matrycę RNA, który jest niezbędny podczas wczesnego rozwoju embrionalnego ryb (Pelegri 2003).

Ponadto diploidyzacja zygot metodą udaru ciśnieniowego ma negatywny wpływ na stan organelli komórkowych oraz destabilizuje mikrotubule włókien kariokinetycznych (Crenshaw i in. 1996). Ze względu na niską skuteczność naukowcy sugerują, by podczas tego typu eksperymentów zawsze wykorzystywać jaja o najwyższej jakości. Zaobserwowano, że zbyt długie przebywanie komórek jajowych w jamie ciała samicy, stymulacje hormonalne tarlaków oraz stres wywołany przez warunki hodowli znacząco obniżają jakość jaj. Przeżywalność zarodków rozwijających się z takich oocytów jest dużo niższa głównie przez zaburzenia kariokinetyczne, prowadzące do nieprawidłowości podczas segregacji materiału genetycznego (Aegerter i Jalabert 2004).

## Zastosowanie homozygotycznych osobników i klonalnych linii ryb w badaniach i akwakulturze

Aktualnie trudno wyobrazić sobie badania dotyczące recesywnych alleli bez udziału homozygotycznych ryb.

Genetyczna jednorodność osobników z klonalnych linii pozwala oszacować interakcje genotyp–środowisko i fenotypową plastyczność takich cech jak dyferencjacja płci i gonad, odpowiedź na stres czy odporność na zachorowania (Bongers i in. 1998, Komen i Thorgaard 2007). Produkcja identycznych, homozygotycznych osobników jest szczególnie ważna w badaniach z zakresu mapowania genów i sekwencjonowania całych genomów. Androgenetyczne ryby można wykorzystać do badań dotyczących fizjologicznych konsekwencji zróżnicowania mitochondriów i mtDNA. Zróżnicowane tempo rozwoju pstrągów tęczowych z linii klonalnej związane było właśnie ze zmiennością mitochondrialnego DNA (Brown i in. 2006). Podwojone haploidy i klony mogą zostać użyte w badaniach dotyczących korelacji genetycznej, oddziaływania genów i ich fenotypowych konsekwencji. Homozygotyczne i klonalne osobniki wykorzystuje się w pracach mających na celu mapowanie loci (genów) cech ilościowych (QTLs). Opracowanie molekularnych markerów niektórych cech ilościowych, takich jak jakość tkanki mięśniowej czy odporność na choroby, wymaga prowadzenia badań z wykorzystaniem podwojonych haploidów, w celu uzyskania informacji na temat wpływu na te cechy czynników pozagenetycznych.

Pod znakiem zapytania stoi zastosowanie podwojonych haploidów i klonów w programach selekcyjnych, które z założenia wymagają wielu osobników o dużej zmienności genetycznej. Ale wykorzystanie osobników homozygotycznych jako tarlaków, może skutkować uzyskaniem w następnym pokoleniu ryb bardziej jednorodnych pod względem cech użytkowych. Z drugiej strony krzyżując ryby pochodzące z dwóch różnych linii homozygotycznych lub klonalnych można uzyskać efekt heterozji u potomstwa. Ponadto zastosowanie w programach hodowlanych homozygotycznych samców i tak zwanych neosamców, czyli genetycznych samic, które po stymulacji hormonalnej wykształciły samcze gonady, pozwala wyprodukować linie ryb złożone tylko z samców lub tylko z samic.

## Przykłady homozygotycznych osobników i klonalnych linii ryb

Pomimo wielu trudności towarzyszących eksperymentom mającym na celu wyprodukowanie homozygotycznych gynogenetycznych i androgenetycznych ryb, podwojone haploidy udało się uzyskać w przypadku kilku modelowych gatunków oraz kilku gatunków mających duże znaczenie gospodarcze. Nieliczne z uzyskanych w wyniku gynogenezy czy androgenezy osobników przeżywają do etapu dojrzałości płciowej, a z tych, które tę dojrzałość osiągają, tylko niektóre są w stanie wyprodukować dobrej jakości gamety. Dlatego też tak trudno jest uzyskać pokolenia klonalne ryb. W przypadku gatunków modelowych klonalne linie wyprodukowano w przypadku danio przęgowanego (*Danio rerio*)

i medaki (*Oryzias latipes*). Jeżeli zaś chodzi o gatunki hodowane w warunkach akwakultury, to metody produkcji klonalnych linii sprawdziły się u pstrąga tęczowego, karpia (*Cyprinus carpio*), tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*) czy łososia pacyficznego (*Oncorhynchus masou*) (Komen i Thorgaard 2007).

W przypadku karpia, homozygotyczne osobniki wykorzystano w badaniach nad dziedziczalnością indeksu gonadosomatycznego, wielkości ikry i jej jakości. Ponadto androgenetyczne podwojone haploidy badano w doświadczeniach dotyczących odpowiedzi na stres (Bongers i in. 1998). Eksperymenty z zakresu mapowania genów cech ilościowych (QTLs) prowadzi się z pomocą podwojonych haploidów pstrąga tęczowego. Wiele z genów cech ilościowych bada się wykorzystując osobniki uzyskane w wyniku inseminacji jaj, pobranych od zwykłych heterozygotycznych samic, nasieniem pochodzącym od osobników klonalnych. Klonalne linie pstrąga tęczowego charakteryzują się polimorfizmem chromosomu Y i dlatego też ryby te są wykorzystywane w badaniach dotyczących ewolucji chromosomów płci (Komen i Thorgaard 2007).

## Podsumowanie

Homozygotyczne osobniki i klonalne linie ryb budzą nadzieje na zbudowanie ważnych dla akwakultury stad, które wykażą zwiększoną wydajność produkcji. W przyszłości mogą one stanowić drogę do stałego i wartościowego źródła pożywienia. Jednak na chwilę obecną techniki uzyskiwania takich osobników wymagają optymalizacji, w celu zwiększenia ich skuteczności.

## Literatura

- Aegerter S., Jalabert B. 2004 – Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* – Aquaculture 231: 59-71.
- Bongers A.B.J., Sukkel M., Gort G., Komen J., Richter C.J.J. 1998 – Development and use of genetically uniform strains of common carp in experimental animal research – Lab. Anim. 32: 349-363.
- Brown K.H., Thorgaard G.H. 2006 – Mitochondrial and nuclear inheritance in an androgenetic line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* – Aquaculture 204: 323-35.
- Chourrout D. 1986 – Use of grayling sperm (*Thymallus thymallus*) as a marker for the production of gynogenetic rainbow trout (*Salmo gairdneri*) – Theor. Appl. Genet. 72: 633-636.
- Crenshaw H., Allen J., Skeen V., Harris A., Salmon E. 1996 – Hydrostatic pressure has different effects on the assembly of tubulin, actin, myosin II, vinculin, talin, vimentin, and cytokeratin in mammalian tissue cells – Exp. Cell Res. 227: 285-297.
- Dunham R.A. 2004 – Aquaculture and fisheries biotechnology : genetic approaches – CABI Publishing: 54-64.
- Komen H., Thorgaard G.H. 2007 – Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review – Aquaculture 269: 150-173.
- Liu S., Duan W., Tao M., Zhang C., Sun Y., Shen J., Wang J., Luo K., Liu Y. 2007 – Establishment of the diploid gynogenetic hybrid clonal line of red crucian carp x common carp – Sci. China (C: Life Sci.) 50(2): 186-193.
- Michalik O., Dobosz S., Wójcik I., Zalewski T., Ocalewicz K. 2014 – Use of eggs derived from the interspecific charr hybrids to induce androgenetic development of the brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchell1814) – Reprod. Domestic Anim. 49(2): 191-6.

Ocalewicz K., Dobosz S., Kuzminski H., Nowosad J., Goryczko K. 2010 – Chromosome rearrangements and survival of androgenetic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – J. Appl. Genetics 51: 309-317.  
Ocalewicz K., Jankun M., Luczynski M. 2006 – Cytogenetic analysis of interspecific hybrids and chromosome set manipulated finfish – In: Fish

Cytogenetics. Eds: E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti, B.G. Kapoor – Science Publisher, Inc.: 289 -332.  
Pelegri F. 2003 – Maternal factors in zebrafish development – Dev. Dyn. 228: 535-554.  
Thorgaard G.H. 1986 – Ploidy manipulations and performance – Aquaculture 57: 57-64.

*Przyjęto po recenzji 31.03.2015 r.*

---

## **PRODUCTION AND USE IN AQUACULTURE OF HOMOZYGOUS FISH AND CLONAL FISH LINES**

**Krzysztof Jagiełło, Konrad Ocalewicz**

**ABSTRACT.** Increasing aquaculture productivity is achieved by applying various techniques associated with feeding, reproduction, genetics, and improved fish health. Thanks to genomic engineering methods such as gynogenesis, androgenesis, and polyploidization, it has been possible, with some fish species, to develop production technologies for single-sex and infertile triploid female stocks. Both gynogenesis and androgenesis permit producing homozygous individuals and clonal lines of fish. Mitotic gynogenesis is achieved by activating eggs with sperm that have been deactivated with UV radiation, and then duplicating the maternal genetic material. Androgenic individuals are obtained by inseminating radiated eggs with sperm in which the DNA is intact, and then later parental chromosome diploidization duplication. Clonal fish lines can be obtained through subsequent rounds of androgenesis and gynogenesis using gametes from homozygous gynogenic or androgenic individuals. Cross breeding individuals from two different homozygous or clonal lines can produce progeny with rapid growth, higher body weights, and increased immunity to disease (heterosis effect). Homozygous fish are used in gene mapping and sequencing studies. Homozygous and clonal fish stocks are used in selection and rearing programs, in quantitative gene studies, and in studies on the impact of the environment on phenotype. Clonal fish lines permit estimating genotype–environment interaction and the phenotype plasticity of the characters of individuals. Androgenic individuals can be used in studies of mitochondrial variability and mtDNA.

**Keywords:** androgenesis, chromosomes, genome, gynogenesis, homozygous individuals, clonal lines