

# **Innowacyjne technologie manipulacji płcią ryby**

Agnieszka Sikora, Krystyna Demska-Zakęś

Katedra Ichtologii

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

Olsztyn

**Obecnie istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój akwakultury, zarówno w Polsce, jak i na świecie jest wzrost zapotrzebowania na mięso ryb i materiał zarybieniowy (ochrona bioróżnorodności). W celu zwiększenia podaży produktów rybnych sukcesywnie wzrasta odsetek ryb pochodzących z chowu i hodowli w intensywnych systemach produkcyjnych, często w oparciu o innowacyjne technologie. W ostatnich latach w wielu krajach, w tym i w Polsce odnotowuje się duże zainteresowanie technologiami produkcji jednopłciowych lub sterylnych stad ryb. Zastosowanie tych technologii pozwala m.in. na zredukowanie zachowań agresywnych, obniżenie współczynników pasz, zwiększenie tempa wzrostu i przeżywalności ryb, poprawę jakości mięsa, czy też zwiększenie wydajności rzeźnej.**

**Podstawą do projektowania technologii produkcji jednopłciowych lub sterylnych stad ryb jest znajomość mechanizmów determinacji i dyferencjacji płci ryb, procesu gametogenezy i embriogenezy oraz zasad i technik przeprowadzania manipulacji genetycznych i/lub farmakologicznych. Generalnie, nie jest to zadanie proste, gdyż u ryb występują znaczne różnice gatunkowe m.in. w przebiegu determinacji i dyferencjacji płci, a kształtowanie i rozwój układu rozrodczego uwarunkowane są przez kompleks czynników wewnętrznych i zewnętrznych. Bezpośrednio ukierunkowane zmiany płci ryb można przeprowadzić wykonując takie zabiegi jak: gynogeneza, androogeneza, poliploidyzacja czy hybrydyzacja. Ze względu na stosunkowo wysokie koszty i niską efektywność większości ww. procedur, w praktyce lepszym rozwiązaniem jest wyprodukowanie tarlaków (neosamców lub neosamic) o specyficznych cechach (metoda pośrednia). W akwakulturze ryb łososiowatych głównym elementem technologii produkcji jednopłciowych samiczych stad ryb jest wytworzenie neosamców - osobników o genotypie samiczym i funkcjonalnym samiczym układzie rozrodczym. Takie ryby można uzyskać przeprowadzając najpierw zabieg gynogenezy, a następnie dokonując farmakologicznej maskulinizacji.**

## **Wstęp**

W akwakulturze coraz większą rolę odgrywają technologie wykorzystujące najnowszą wiedzę oraz osiągnięcia techniczne (Donaldson 1996). Szczególnie w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie hodowców technologiami chowu i hodowli ryb w stadach jednopłciowych (częściej samiczych,

rzadziej samiczych) lub sterylnych (ryby triploidalne), co związane jest z obniżeniem nakładów finansowych produkcji oraz zwiększeniem zysków (Piferrer 2001). Zastosowanie tych technologii pozwala bowiem m.in. na zredukowanie zachowań agresywnych, obniżenie współczynników

pasz, zwiększenie tempa wzrostu i przeżywalności ryb, poprawę jakości mięsa, czy też zwiększenie wydajności rzeźnej. Ukie-  
runkowane zmiany płci ryb można przepro-  
wadzić stosując preparaty farmakologiczne  
lub wykonując takie zabiegi jak: gynogeneza,  
androgenesa, poliploidyacja, czy hy-  
brydyzacja (Ihssen i in. 1990). Podstawą do  
projektowania technologii produkcji jedno-  
płciowych lub sterylnych stad ryb jest zna-  
jomość mechanizmów determinacji  
i dyferencjacji płci ryb, procesu gametoge-  
nezy i embriogenezy oraz zasad i technik  
przeprowadzania manipulacji genetycznych  
i/lub farmakologicznych.

Większość ryb są to zwierzęta rozdzielno-  
płciowe, co oznacza, że dojrzałe samce pro-  
dukują plemniki, a samice wytwarzają  
wyłącznie komórki jajowe. Wiele gatunków  
ryb nie posiada narządów umożliwiających  
wprowadzenie plemników do dróg rodnych  
samicy, więc występuje u nich zjawisko za-  
płodnienia zewnętrznego. Komórki rozrod-  
cze wydalane są bezpośrednio do wody,  
w której dochodzi do połączenia gamet mę-  
skich i żeńskich. Warunkiem, jaki musi być  
spełniony aby doszło do skutecznego za-  
plemnienia, musi być zbliżenie samic i sam-  
ców biorących udział w tarle oraz  
jednoczesne uwolnienie komórek rozrod-  
czych. Hermafrodytyzm, czyli wytwarzanie  
przez jeden organizm jaj i plemników, u ryb  
występuje bardzo rzadko (Bieniarz i Epler  
1991).

Mimo że strategie tworzenia produktów  
płciowych oraz tarła mogą być różne w za-  
leżności od gatunku ryb, większość wyka-  
zuje cechy wspólne w działaniach  
prowadzących do powstania dojrzałych gamet.  
Oogeneza jest procesem powstawania  
komórek jajowych z pierwotnej komórki  
płciowej. W wyniku licznych podziałów mi-

totycznych z pierwotnych komórek płcio-  
wych powstają gonocyty, a następnie oogo-  
nie. Komórki oogonialne różnicują się  
w oocyty I rzędu. W wyniku następujących  
po sobie podziałów redukcyjnego i ekwacyj-  
nego powstaje komórka jajowa i ciało kie-  
runkowe. U ryb podczas oogenezy proces  
mejozy nie zachodzi w sposób ciągły. Pier-  
wszy podział mejotyczny zostaje zablokowany  
już w profazie I podziału mejotycznego.  
Podczas bloku diplotenowego oocyt rozwija  
się i rośnie, przechodząc proces prewitello-  
genezy i witellogenezy (Demska-Zakęś  
1994). Po zgromadzeniu odpowiedniej ilości  
żółtka następują dalsze etapy pierwszego  
podziału mejotycznego. W ich konsekwencji  
powstają dwie komórki: większa oocyt II  
rzędu oraz mniejsza I ciało kierunkowe.  
Oocyt II rzędu przekształcany jest w komór-  
kę jajową w wyniku drugiego podziału mejo-  
tycznego. Podczas tego procesu mejoza jest  
ponownie hamowana. Komórki jajowe uwal-  
niane przez samicę do środowiska wodnego  
w trakcie tarła znajdują się w stadium meta-  
fazy drugiego podziału mejotycznego. W tym  
stadium następuje zaplemnienie i pobudze-  
nie komórki do dokończenia podziału ekwa-  
cyjnego. Po podziale i wyrzuceniu II ciała  
kierunkowego dochodzi do kariogamii  
(Demska-Zakęś 1994).

### **Determinacja i dyferencjacja płci u ryb**

Wiele gatunków ryb używa systemów gene-  
tycznych, które determinują płeć podczas  
zapłodnienia, niektóre korzystają z we-  
wnętrznych wskazówek dostarczanych po-  
przez oddziaływania behawioralne u tego  
samego gatunku, podczas gdy inne wyko-  
rzystują zmienne czynniki środowiskowe,  
takie jak temperatura (Baroiller i in. 1999,  
Baroiller i D'Cotta 2001).

Geny mogą stać się dominującym czynni-  
kiem w kształtowaniu kierunku determinacji



płci tak, że czynniki środowiskowe mają niewielki wpływ. Niektóre geny mogą kierować rozwojem jajników, a inne rozwojem jąder. Płeć konkretnego osobnika będzie określana przez siłę czynników genetycznych otrzymanych z rodziców (Devlin i Nagahama 2002). Ryby są najbardziej zróżnicowaną grupą kręgowców pod względem typów chromosomowych systemów determinacji płci (Solari 1994). Wyróżnia się 9 systemów chromosomowej determinacji płci. Równorzędnie z badaniami nad identyfikacją chromosomów płci ryb prowadzone są eksperymenty polegające na zidentyfikowaniu genów determinujących płeć. Molekularne badania chromosomu Y u ssaków pozwoliły wyizolować fragment DNA dla niego specyficzny, a gen ten nazwano SRY (ang. Sex Determining Region Y Gene). Obecność fragmentu tego genu powoduje przekształcenie gonady pierwotnej w męską (Koopman i in. 1991). Niestety wiedza na temat genów, które determinują płeć u ryb, jest wciąż niewielka. W celu uzyskania odpowiedzi, które z genów mają wpływ na determinację płci, prowadzi się badania z użyciem organizmów modelowych. U ryb jednym z organizmów wykorzystywanym w badaniach genetycznych jest medaka (*Oryzias latipes*). Badania wykazały, iż fragment DNA, który determinuje płeć samczą u medaki, jest gen *dmrt1bY* (Kondo i in. 2003).

Zdeterminowana płeć realizuje się podczas procesu dyferencjacji. Jest to proces, zachodzący w różnym okresie życia ryb (nawet kilka-kilkanaście miesięcy po wykluciu), w którym dochodzi do różnicowania się gonad (dyferencjacja anatomiczna) oraz różnicowania się pierwotnych komórek płciowych w oogonia lub spermatogonia (dyferencjacja cytologiczna) (Demska-Zakęś

1995, Devlin i Nagahama 2002). W procesie tym kluczową rolę pełnią hormony steroidowe: androgeny i estrogeny, niezbędne do prawidłowego rozwoju samców i samic. Prekursorem hormonów steroidowych jest cholesterol, który przekształcany jest w hormony steroidowe w szlaku metabolicznym, w którym udział biorą monooksygenazy P-450 (Berg i in. 2007). Istotnym etapem rozwoju gonad jest przekształcenie testosteronu do  $17\beta$  estradiolu. Konwersja ta jest katalizowana przez aromatazę testosteronu. Aromataza jest enzymem należącym do kompleksu cytochromu P450 i składa się z dwóch różnych białek kodowanych przez gen *Cyp 19*. Gen *Cyp 19a1a* ma miejsce ekspresji w retikulum endoplazmatycznym gładkim komórek steroidotwórczych i często określany jest jako „gen gonadalny” (Simpson i in. 1994). Proces dyferencjacji gonad jest bardzo niestabilny i może zostać zakłócony poprzez egzogenne hormony lub związki chemiczne znajdujące się w wodzie (Demska-Zakęś 2005).

### **Technologie manipulacji płcią ryb** **Manipulacje farmakologiczne**

W celu otrzymania jednopłciowych stad ryb w okresie dyferencjacji gonad stosuje się egzogenne hormony steroidowe. Bezpośrednio (w pierwszym pokoleniu) ukierunkowany rozwój płci gonadowej można osiągnąć podając rybom odpowiednie dawki (bardzo różne dla różnych gatunków ryb) egzogennych estrogenów lub androgenów. W zależności od czasu i tempa różnicowania gonad hormony aplikuje się w imersji i/lub w pokarmie. Można również zastosować implanty dootrzewnowe lub iniekcje. Najczęściej stosowanym hormonem do indukcji rozwoju płci żeńskiej jest  $17\beta$ -estradiol (Devlin i Nagahama 2002). Natomiast maskulinizację ryb przeprowadza się podając

17 $\alpha$ -metylotestosteron lub 11 $\beta$ -hydroksyandrostendion. Obecnie steroidy znacznie częściej wykorzystywane są do produkcji stad jednopłciowych w drugim pokoleniu (tzw. metoda pośrednia). Ta technologia jest z powodzeniem stosowana w akwakulturze ryb łososiowatych m.in. pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Samicze stada tego gatunku można uzyskać poprzez wykorzystanie do zapłodnienia ikry nasienia pochodzącego od neosamców (ryb o genotypie XX z męskim układem rozrodczym). W tym celu przeprowadza się maskulinizację ryb przy użyciu 11 $\beta$ -hydroksyandrostendionu lub 17 $\alpha$ -metylotestosteronu. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej od wyselekcjonowanych (np. metodami cytogenetycznymi) neosamców pobiera się nasienie, które wykorzystywane jest do zapłodnienia ikry normalnych samic (Demska-Zakęś i in. 2005). Selekcja samców o genotypie XX nie jest konieczna, jeżeli maskulinizacja przeprowadzona zostanie na pstrągach poddanych wcześniej zabiegowi gynogenezy (patrz: kolejny podrozdział niniejszej pracy).

Metoda inwersji płci przy użyciu androgenów jest dość skuteczna, aczkolwiek ma swoje wady. Po zastosowaniu egzogennych hormonów, zwłaszcza 17 $\alpha$ -metylotestosteronu, może dojść do zaburzeń rozwoju i funkcjonowania gonad. Jądra mogą charakteryzować się nietypowym kształtem lub wielkością. Może wykształcić się tylko jedno jądro lub może dojść do sytuacji, że nie wykształcą się nasieniowody lub będą one niedrożne (Hliwa i in. 2011). W celu uzyskania nasienia od takich neosamców należy uśmiercić osobniki, a gonady poddać maceracji. Dodatkowo, pozyskany mlecz może zawierać małą ilość ruchliwych plemników, co poniekąd może wpływać na ilość zapłodnionej ikry (Robles i in. 2003). Z tego

względu w ostatnich latach prowadzone są prace nad opracowaniem alternatywnych technologii produkcji neosamców, np. z zastosowaniem preparatów farmakologicznych zawierających inhibitor aromatazy testosteronu. Aromataza występuje w mięśniach, wątrobie, tkance tłuszczowej i przekształca androstendion oraz testosteron do estradiolu (Mokbel 2002). Na rynku występuje wiele leków, które hamują aktywność aromatazy testosteronu. W zależności od sposobu działania można podzielić je na dwie grupy: kompetencyjne inhibitory aromatazy i samobójcze. Pierwsze z nich działają poprzez blokowanie miejsca katalitycznego w sposób odwracalny. Samobójcze inhibitory także blokują miejsce katalityczne enzymu, jednak w sposób nieodwracalny (Brueggemeier i in. 2005). Według klasyfikacji opierającej się na czasie udostępniania i badaniach klinicznych inhibitory, aromatazy można podzielić na trzy generacje. Farmaceutyki należące do pierwszej generacji są lekami o szerokim spektrum działania. Druga generacja leków działa bardziej wybiórczo, a leki należące do trzeciej generacji reagują wyłącznie z aromatazą testosteronu (Potemski i Płużyńska 1998). Do farmaceutyków zaliczanych do grupy inhibitorów aromatazy należy np. fadrozol. Podawanie fadrozolu tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*) w paszy powoduje zwiększony odsetek samców w stosunku do kontroli (Eleraky i in. 2011). Co istotne, ryby te mają w pełni funkcjonalny układ rozrodczy.

## **Manipulacje genetyczne**

### Gynogeneza

Indukcja gynogenezy jest jedną z metod uzyskiwania populacji samiczych. Proces ten zachodzi naturalnie u niektórych gatunków nicieni, owadów, ryb (np. u ryb kozo-



watych (*Cobitidae*) lub niektórych karpio-watych np. karasia chińskiego (*Carassius auratus*) i płazów (Kiester i in. 1981, Devlin i Nagahama 2002).

Sztuczna gynogeneza jest procesem, który pozwala przekazać potomstwu materiał genetyczny pochodzący tylko od matki, a dodatkowo uzyskać jednopłciowe samicze stado ryb (jeżeli zabieg ten jest przeprowadzany na gatunkach ryb o systemie determinacji płci XY lub pokrewnych, jak to ma miejsce np. u pstrąga tęczowego). Zabieg indukcji gynogenezy można przeprowadzić zaburzając proces mejozy (gynogeneza mejozyczna) lub mitozy (gynogeneza mitotyczna). Zaburzenia podziału zaplemnionej komórki jajowej lub zygoty dokonuje się wykonując udar środowiskowy (szok) termiczny albo ciśnieniowy. Szok termiczny zazwyczaj polega na zanurzeniu zaplemnionych jaj lub zygot albo w zimnej (w przypadku gatunków ciepłolubnych), albo ciepłej wodzie (w przypadku gatunków zimnolubnych). Natomiast podczas stosowania udaru ciśnieniowego komórki umieszcza się w komorze wytwarzającej wysokie ciśnienie. Zastosowanie szoku ciśnieniowego jest najlepszą, aczkolwiek kosztowną metodą indukcji gynogenezy (Pandian i Koteeswaran 1998). Parametry szoku oraz czas jego działania decydują o efektach zabiegu i muszą one zostać wyznaczone eksperymentalnie dla każdego gatunku ryb (Jankun i in. 2008). W warunkach laboratoryjnych do przeprowadzenia udaru można wykorzystać substancje chemiczne np. cytochalazynę B lub kolchicynę (Pandian i Koteeswaran 1998).

Gynogeneza mejozyczna to proces, w którym diploidalne organizmy gynogenetyczne powstają w wyniku zatrzymania II ciała kierunku, dzięki czemu nie dochodzi

do zredukowania materiału genetycznego oocyta. Materiał genetyczny pochodzący od ojca nie jest przekazywany; plemnik służy tylko do pobudzenia komórki jajowej. Dezaktywacja materiału genetycznego plemnika następuje w wyniku promieniowania UV, rzadziej promieniowania jonizującego. Dawkę i czas naświetlenia należy dobrać tak, aby doszło do całkowitego zniszczenia DNA bez uszkodzenia aparatu ruchowego plemnika (Jankun i in. 2008). Zaplemnioną takim plemnikiem komórkę jajową należy poddać szokowi środowiskowemu w celu zatrzymania II ciała kierunku. W wyniku działania udaru powstaje zygota ( $2n$ ) z wyłącznie żeńskim materiałem genetycznym (gynogenetyczna heterozygota) (Ihssen i in. 1990).

W gynogenezie mitotycznej diploidalne organizmy indukowane są w wyniku zatrzymania pierwszego podziału mitotycznego zygoty. Materiał genetyczny ojca jest tak samo jak w przypadku gynogenezy mejozycznej dezaktywowany, a plemnik służy tylko do pobudzenia komórki jajowej. Tuż przed rozpoczęciem bruzdkowania stosuje się szok w celu zniszczenia wrzeczona kariokinetycznego i podwojenia ilości materiału genetycznego do  $2n$ . W tym przypadku powstające organizmy są gynogenetycznymi homozygotami (Jankun i in. 2008).

Sztuczne wywoływanie gynogenezy, zwłaszcza mitotycznej, może prowadzić do powstania wad rozwojowych u potomstwa. W wyniku źle przeprowadzonej procedury niszczenia DNA plemnika lub przeprowadzenia zbyt późno udaru środowiskowego, może powstać potomstwo z mozaicyzmem komórkowym. Jest to choroba, która powoduje występowanie komórek o różnej ploidalności u jednego osobnika (Lin i in. 2001).

## Androgeneza

Celem androgenезy jest otrzymanie osobników u których cały jądrowy materiał genetyczny będzie pochodził od ojca. Androgeneza jest trudniejszym do wykonania zabiegiem, niż gynogenезa. Wiąże się to z koniecznością dezaktywacji DNA komórki o stosunkowo dużych rozmiarach bez naruszenia/uszkodzenia mitochondrialnego DNA i żółtka (materiału odżywczego dla embriónów i larw). Podczas procesu androgenезy diploidalne organizmy produkowane są poprzez zatrzymanie I podziału mitotycznego komórki, czyli homozygoty eksponowane są na działanie późnego szoku środowiskowego. Jądrowy materiał genetyczny pochodzący od matki jest dezaktywowany za pomocą promieniowania jonizującego (zwłaszcza gamma) lub UV. Następnie tak inaktywowane oocyty zaplemniane są normalnymi plemnikami i poddawane udarowi środowiskowemu. Podobnie, jak w przypadku gynogenезy, stosuje się szok termiczny lub ciśnieniowy. W wyniku androgenезy można uzyskać stado wyłącznie samcze (u gatunków z systemem determinacji płci WZ lub pokrewnym) lub, jak w przypadku pstrąga tęczowego, stado mieszane o genotypie XX (samice) lub YY (supersamce) (Kucharczyk 2002).

Proces androgenезy ze względu na niską przeżywalność materiału (kilka %) nie ma obecnie znaczenia komercyjnego. Natomiast w powiązaniu technologią kriokonserwacji nasienia jest jedną z technik ochrony populacji i stad ryb (Komen i Thorgaard 2007).

## Poliploidyzacja

Komórki somatyczne, które posiadają jądro, wyposażone są w charakterystyczną dla danego gatunku liczbę chromosomów tworzących kariotyp. Większość ryb to organizmy

diploidalne, co oznacza, że mają one dwa komplety chromosomów - jeden z tych zestawów pochodzi od matki, drugi natomiast odziedziczony został po ojcu (Boroń 2001). Należy jednak podkreślić, że wśród ryb są też gatunki poliploidalne (Juchno 2004). Występowanie takich ryb w środowisku naturalnym stało się przesłanką do opracowania technologii produkcji poliploidów.

Inżynieria genetyczna ryb rozpoczęła się właśnie od technik tri- i tetraploidyzacji, ze względu na to, iż hodowcy ryb byli zainteresowani pozyskiwaniem i hodowlą bezpłodnych poliploidalnych osobników. Ryby triploidalne mogą szybciej rosnać, ponieważ nie wykorzystują energii z pokarmu na rozwój gonad i komórek rozrodczych. Hodowla ryb, które są bezpłodne, wyeliminowuje problemy związane z dojrzewaniem płciowym, takie jak: obniżenie jakości mięsa, spadek tempa wzrostu, zwiększona śmiertelność (Dobosz i in. 1995).

Triploidalne osobniki otrzymywane są w wyniku zatrzymania procesu mejozy poprzez działanie udaru środowiskowego na zaplemnione jaja. Gdy plemnik wniknie do oocytu, jądro tego oocytu dzieli się i wytwarza haploidalne jądro oocytu oraz drugie ciało kierunkowe. Jeżeli w tym czasie zaplemniony oocyt zostanie poddany szokowi środowiskowemu, to wyrzucenie drugiego ciała kierunkowego z komórki zostanie zatrzymane. W ten sposób w zapłodnionym jaju znajdują się trzy haploidalne genomy: jądro jaja, jądro drugiego ciała kierunkowego (materiał genetyczny od matki) oraz jądro plemnika (materiał genetyczny od ojca). W kolejnym etapie następuje połączenie się tych trzech jąder i powstaje triploidalna zygota ( $3n$ ), która nazywana jest zygotą autotriploidalną. Organizm triploidalny można również otrzymać poprzez skrzyżowanie



osobnika diploidalnego (plemnik) z tetraploidalnym (komórka jajowa) (Boroń 2001). Tetraploidy są to organizmy, które powstają, gdy zatrzymany zostanie pierwszy podział mitotyczny diploidalnej zygoty. Podczas końcowej fazy mitozy, przed podziałem komórki zygoty na dwie komórki potomne, wszystkie chromosomy ulegają procesowi replikacji, ploidalność zmienia się z  $2n$  do  $4n$ . Gdy poprzez zastosowanie udaru zostanie przerwane dokończenie pierwszego podziału zygoty, zarodek zostanie w stanie jednokomórkowym, a dwa diploidalne jądra złączą się i stworzą jądro tetraploidalne ( $4n$ ) (Kuciński i Jankun 2008).

### Hybrydyzacja

Hybrydyzacja jest procesem, w którym z komórek o odmiennym genotypie, różniących się pewnymi cechami genetycznymi, powstaje organizm potomny nazywany mieszańcem lub hybrydą (Dowling i Secor 1997). U ryb, częściej niż u innych kręgowców, obserwuje się występowanie organizmów powstałych na drodze hybrydyzacji. Jest to związane z zapłodnieniem zewnętrznym oraz specyfiką środowiska życia. W warunkach kontrolowanych hybrydyzacja np. ryb łososiowatych jest łatwa w realizacji. Natomiast w warunkach naturalnych międzygatunkowe krzyżówki np. łosiosia (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta*) pojawiają się bardzo rzadko, dzięki obecności mechanizmów izolacyjnych związanych głównie z rozdzieleniem miejsc tarłowych (Garcia de Léaniz i Verspoor 1989).

Duże znaczenie w procesie hybrydyzacji ma zjawisko heterozji, która jest wynikiem uzupełnienia korzystnych genów pochodzących od rodziców, co np. może prowadzić do szybszego wzrostu organizmów (Cowx 1983). Korzystną cechą hybryd jest często większa odporność na choroby, czy toleran-

cja na zmniejszoną zawartość tlenu w wodzie (Schlosser i in. 1998).

Poprzez hybrydyzację można otrzymywać jednopłciowe stada ryb. W tym celu do krzyżowania wybiera się gatunki spokrewnione o odmiennych systemach determinacji płci, tj. WZ i XY. Takie zróżnicowanie występuje np. u tilapii. Przykładowo, tilapia nilowa (*Oreochromis niloticus*) ma system determinacji płci XY, natomiast spokrewniona z nią tilapia czerwona (*O. aureus*) ma system WZ (Wohlfarth i in. 1990). Krzyżując samice tilapii nilowej (XX) z samcami tilapii czerwonej uzyskuje się samcze stado hybryd tych gatunków. Jest to korzystne, gdyż takie tilapie cechuje szybki wzrost, szeroka tolerancja względem rodzaju pasz oraz jakości wody, większa odporność na choroby, dobra jakość mięsa, wysoka wydajność rzeźna (Wohlfarth i in. 1990).

### **Podsumowanie**

W akwakulturze coraz większym zainteresowaniem cieszą się technologie produkcji jednopłciowych stad ryb. Podstawy technologii produkcji stad jednopłciowych gatunków ryb zostały opracowane, jednak uzyskiwane efekty nie zawsze są satysfakcjonujące. Dlatego też ten obszar badań nadal się rozwija. Innowacyjne technologie manipulacji płcią ryb cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na możliwość otrzymywania stad jednopłciowych lub sterylnych, a co za tym idzie, osobników o szybszym tempie wzrostu, lepszej jakości mięsa, większej odporności na choroby.

Jedną ze skutecznych metod kontrolowania płci ryb są zabiegi manipulacji genetycznych nazywane technikami inżynierii genomowej. Techniki te polegają na indukcji rozwoju zarodków z udziałem tylko samczego lub tylko samczego genomu jądrowego oraz na tworzeniu zarodków

poliploidalnych. Stada samicze uzyskuje się w wyniku ginogenezy, natomiast w wyniku androgenezy uzyskuje się stada samcze. Poilploidydzacja polega na tworzeniu organizmów, które posiadają więcej niż dwa zestawy chromosomów. Organizmy triploidalne charakteryzują się całkowitą sterylnością, przez co tempo wzrostu nie ulega spowolnieniu, a jakość mięsa jest wysoka. Hybrydyzacja stała się jedną z metod biotechnologicznych poprzez które otrzymuje się populacje o większej tolerancji na zimno, zasolenie, stężenie amoniaku oraz o szybszym tempie wzrostu i wyższej odporności na choroby.

Do manipulacji płcią ryb oprócz technik inżynierii genetycznej wykorzystuje się również farmaceutyki. Badania nad hormonami

steroidowymi i ich wpływie na układ rodzący ryb nadal trwają. Eksperymenty tego typu mają na celu wykazanie jak farmaceutyki wpływają na układ płciowy i dokrewny organizmów wodnych oraz poszukiwanie i testowanie nowych preparatów pod kątem wykorzystania ich do inwersji płci. Stosowanie środków hormonalnych do zmiany płci podczas tarła budzi wiele kontrowersji. Alternatywą stosowania hormonów jest użycie środków farmakologicznych, które zawierają inhibitor aromatazy testosteronu blokujący biosyntezę estradiolu z testosteronu. Dzięki temu poziom androgenów w organizmie wzrośnie i rozwinię się męski układ płciowy u ryb o genotypie XX, a w następnym pokoleniu będzie można wyhodować populację samiczą.

#### **Bibliografia:**

1. Baroiller J. F., D'Cotta H. D., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 130C: 399-409
2. Baroiller J. F., Guiguen Y., Fostier A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55: 910-931.
3. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., 2007. *Biochemia*. Wydawnictwo PWN, Warszawa, s. 734-760.
4. Bieniarz K., Epler P., 1991. *Rozród ryb*. LETRA, Kraków.
5. Boroń A., 2001. Koza (*Cobitis taenia* Linnaeus, 1758) - co naprawdę chronimy? *Metody cytogenetyczne jako narzędzie rozpoznawania niektórych gatunków ryb*. *Roczniki Naukowe PZW*, 14, Supl.: 339-351.
6. Brueggemeier R. W., Hackett J. C., Diaz-Cruz E. S., 2005. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocrine Reviews* 26(3): 331-345.
7. Cowx I.G., 1983. The biology of bream *Abramis brama* (L), and its natural hybrid with roach, *Rutilus rutilus* (L) in the River Exe. *J. Fish. Biol.* 22, 631-646.
8. Demska-Zakęś K., 1994. Dyferencjacja płci i cykl rocznego rozwoju gonad hybrydów pelugi i siei (*Coregonus peled* x *Coregonus lavaretus*, *Coregonus lavaretus* x *Coregonus peled*) z dwóch jezior Pojezierza Mazurskiego. *Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie, rozprawa doktorska*:1-60.
9. Demska-Zakęś K., 1995. Dyferencjacja płci u ryb. *Komunikaty Rybackie*, 2: 18-19.
10. Demska-Zakęś K., 2005. Wpływ wybranych ksenobiotyków na rozwój układu płciowego ryb. *Rozprawy i Monografie*. Wydawnictwo UWM, Olsztyn s 7-11, ISBN 83-7299-384-X.
11. Demska-Zakęś K., Hliwa P., Zakęś Z., 2005. Hormonalne manipulacje ryb sumokształtnych. W: *Rozród, podchów, profilaktyka ryb sumokształtnych i innych gatunków* (red. Z. Zakęś), Wydawnictwo IRŚ, Olsztyn, s 31-40. ISBN 83-87506-74-5.
12. Devlin R. H., Nagahama Y., 2002. Sex determination and sex determination in fish; an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
13. Dobosz S., Goryczko K., Łuczyński M., Backiel T., 1995. Growth and survival of two gynogenetic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) groups and their reciprocal crosses. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 42 (3): 257-268.
14. Donaldson E. M., 1996. Manipulation of reproduction in farmed fish. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 1-4.
15. Dowling T. E., Secor C. L., 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28: 593-619.
16. Eleraky W., Refat N., Abd nEllatif M., Tahia A., Khedr N., 2011. Effects of nonsteroidal aromatase inhibitor in sex reversal of Nile Tilapia (*Oreochromis*



niloticus). *Nature and Science* 9(12): 145-150.

17. Garcia de Léaniz C., Verspoor E., 1989. Natural hybridization between Atlantic salmon, *Salmo salar*, and brown trout, *Salmo trutta*, in northern Spain. *J. Fish Biol.* 34, 41-46.

18. Hliwa P., Kuźmiński K., Dobosz S., Nynca J., Dietrich G. J., Ziomek E., Ciereszko A., 2001. Morfologia gonad a jakość nasienia neosamców pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). W: Nowe gatunki w akwakulturze - rozród, podchów, profilaktyka, (red. Z. Zakęś, K. Demska-Zakęś, A Kowalska), Wydawnictwo IRS, Olsztyn, s. 105-116. ISBN 978-83-6011-155-0.

19. Ihssen P. E., McHay L. R., McMillan I., Philips R. B., 1990. Ploidy manipulation and gynogenesis: cytogenetic and fisheries applications. *Trans. Am.Fish. Soc.* 119: 698-717.

20. Jankun M., Ocalweicz K., Woźnicki P., Kuźmiński H., Dobosz S., 2008. Manipulacje genomowe u ryb łososiowatych: znaczenie, procedury i diagnostyka rezultatów. W: Innowacyjne techniki oceny biologicznej i ochrony cennych gatunków ryb hodowlanych i raków (red. Demska-Zakęś K.), Wydawnictwo IRS, Olszty, s 9-38. ISBN 978-82-60111-28-4.

21. Juchno D., 2004. Rozwój gonad i gametogeneza *Cobitis taenia* L. i naturalnych allopoliploidów *Cobitis* (Pisces, Cobitidae). Mskr. pracydoktorskiej. UWM Olsztyn, 4-10.

22. Kiester A. R., Nagylaki T., Schafer B., 1981. Population dynamics of species with gynogenetic sibling species. *Theoretical Population Biology* 19: 358-369.

23. Komen H., Thorgaard G. H., 2007. Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review. *Aquaculture* 269: 150-173.

24. Kondo M., Nanda I., Hornung U., Asakawa S., Shmizu N., Mitani H., Schmid M., Shima., Scharl M., 2003. Absence of the candidate male sex-determining gene *dmrt1b(Y)* of madaka from other fish species. *Current Biology* 3: 416-420.

25. Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badga R., 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature (London)* 351: 117-121.

26. Kucharczyk D., 2002. Rozród kontrolowany i androgeniza wybranych gatunków ryb

karpioiwatych. Rozprawy i Monografie. Wydawnictwo UWM, Olsztyn

27. Kuciński M., Janku M., 2008. Poliploidyzacja jako narzędzie w biotechnologii ważnych gospodarczo i ekologicznie gatunków ryb na świecie. Zakęś i In. (red.). *Biotechnologia w akwakulturze*. IRŚ, Olsztyn, 15-30.

28. Lin F., Dabrowski K., Luczyński M. J., Luczyński M., 2001. Mosaic individuals found in genetically manipulated northern pike *Esox Lucius* using flow cytometry. *J. Appl. Ichtiol.* 17: 85-88.

29. Mokbel K., 2002. The evolving role of aromatase inhibitors in breast cancer. *The Japan Society of Clinical Oncology* 7: 279-283.

30. Pandian T. J., Koteeswaran R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384: 167-243.

31. Piferrer F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.

32. Potemski P., Płużyńska A., 1998. Inhibitory aromatazy w leczeniu raka piersi. *Onkologia Polska* 3-4: 159-164.

33. Robles V., Cabrera E., Cunado S., Herraez M. P., 2003. Sperm cryopreservation of sex reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture* 224: 203-212.

34. Schlosser I.J., Doeringsfield M.R., Elder J.F., Arqayus L.F., 1998. Niche relationships of clonal and sexual fish in a heterogeneous landscape. *Ecology*, 79, 953-968.

35. Simpson E. R., Mahendroo M. S., Means G.D., Kilgore M. W., Hinshelwood M. M., Graham-Lorence S., Amarneh B., Ito Y., Fisher C. R., Michael M. D., 1994. Aromatase cytochrome p 450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Review* 15: 342-355.

36. Solari A. J., 1994. Sex chromosomes and sex determination in fishes. W: Solari A. J. (ed.) *Sex chromosomes and sex determination in Vertebrates*, s.233-247. CRC Press, Tokyo.

37. Wohlfarth G.W., Hulata G., Halevy A., 1990. Survival, sex ratio and growth of some tilapia species and their interspecific hybrids. *Eur. Aquacult. Soc. Spec. Publ.* 11, 87-101