

## Wykorzystanie procesu androgenezy do indukcji rozwoju haploidów i podwojonych haploidów u wybranych gatunków ryb lososiwatych (Salmonidae)

Oliwia Michalik

Rozród płciowy jest najbardziej powszechnym sposobem rozmnażania wśród zwierząt. Proces ten polega na wytwarzaniu przez osobniki różnych płci haploidalnych samczych i samiczych gamet oraz ich fuzji, w wyniku której powstaje diploidalna zygota. Rozwijający się organizm potomny zawiera geny obojga rodziców. Specyficznymi formami rozmnażania płciowego są procesy gynogenezy i androgenezy. Gynogenezę, czyli rozwój organizmu, którego genom składa się tylko z matczynego DNA opisano u nielicznych gatunków bezkręgowców, ryb i płazów. Jeszcze rzadziej spotyka się zwierzęta, które w warunkach naturalnych rozmnażają się w wyniku androgenezy i dziedziczą wyłącznie ojcowski genom jądrowy. Androgenetyczny rozwój potwierdzono u międzygatunkowych hybryd patyczaków z rodzaju *Bacillus*, u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) oraz u kilku gatunków małż z rodzaju *Corbicula*. W 2017 roku opublikowano pierwsze doniesienie opisujące spontaniczną androgenezę u ryb (kalandio, *Squalius alburnoides*).

Androgenetyczny i gynogenetyczny rozwój zarodków zwierząt kręgowych można indukować w warunkach kontrolowanych. Procesy androgenezy i gynogenezy u ryb zakładają inaktywację gamet poprzez naświetlanie ich wysokimi dawkami promieniowania jonizującego lub UV, które niszczy jądrowy DNA. W wyniku inseminacji napromieniowanych komórek jajowych zwykłym nasieniem otrzymuje się androgenetyczne haploidalne zarodki, natomiast rozwój gynogenetyczny uzyskuje się aktywując komórki jajowe napromieniowanymi plemnikami. Haploidalny zestaw ojcowskich lub matczynych chromosomów jest podwajany poprzez zatrzymanie pierwszego podziału komórkowego w zarodku. W tym celu, w ściśle określonym momencie po zakończeniu procesu replikacji DNA, ale jeszcze przed kariokinezą, haploidalne zarodki poddawane są działaniu udaru środowiskowego, na przykład wysokiego ciśnienia hydrostatycznego lub subletalnych temperatur, co prowadzi do depolimeryzacji mikrotubul wrzeciona podziałowego i udaremnia segregację chromosomów oraz podział jądra komórkowego. W efekcie powstają w pełni homozygotyczne zarodki nazywane androgenetycznymi lub gynogenetycznymi podwojonymi haploidami (ang. *Doubled Haploids*). Haploidalne androgenetyczne i gynogenetyczne zarodki ryb znajdują zastosowanie w badaniach dotyczących fenotypowych konsekwencji występowania recesywnych alleli, funkcji poszczególnych genów czy genetyki nowotworów.

Takie zarodki stanowią również doskonałe źródło haploidalnych zarodkowych komórek macierzystych, mających szerokie zastosowanie w badaniach biomedycznych. Haploidy i podwojone haploidy są szczególnie przydatne w badaniach z zakresu mapowania genów i sekwencjonowania genomów. Procesy gynogenezy i androgenezy wykorzystuje się w programach selekcyjnych do produkcji jednopłciowych stad ryb i osobników o pożądanym cechach hodowlanych. Ponadto, androgeniza z wykorzystaniem kriokonserwowanego nasienia umożliwia odtwarzanie pul genowych cennych linii, populacji, a nawet gatunków (androgeniza międzygatunkowa). Niestety, poważnym ograniczeniem indukowanej androgenezy ryb jest jej mała skuteczność. Niewiele androgenetycznych osobników wykluwa się i dożywa do stadium samodzielnego pobierania pokarmu (około 5%), a tylko pojedyncze ryby dojrzewają płciowo. Za niską skuteczność androgenezy odpowiedzialne są przede wszystkim ujawniające się allele recesywne. Niewykluczone, że równie istotne w kontekście niskiej przeżywalności androgenotów są potencjalne skutki uboczne drastycznych działań, którym poddawane są gamety i haploidalne zarodki podczas indukcji androgenezy oraz wpływ chromosomów płci.

W najszerszym ujęciu celem niniejszej pracy było uzyskanie żywotnego androgenetycznego potomstwa wybranych gatunków ryb łososiowatych (Salmonidae), a cele szczegółowe realizowane poprzez kolejne eksperymenty obejmowały ocenę skuteczności wykorzystania w procesie androgenezy gamet pochodzących od blisko spokrewnionych gatunków ryb łososiowatych oraz ich hybryd [1], określenie w jakim stopniu na śmiertelność androgenotów wpływa proces naświetlania jaj promieniowaniem jonizującym oraz narażanie haploidalnych zarodków na działanie szoku ciśnieniowego [2], zbadanie jaki jest wpływ chromosomów płci na przeżywalność haploidalnych [3] i diploidalnych androgenotów [4] oraz ocenę procesu dyferencjacji płci i rozwoju gonad u androgenetycznych samic (XX) i samców (YY) [4].

Wybór ryb łososiowatych (Salmonidae) do niniejszych badań nie był przypadkowy. Jest to rodzina o autotetraploidalnym pochodzeniu, złożona w większości z gatunków drapieżnych, mających duże znaczenie gospodarcze. Niestety, nadmierna eksploatacja zasobów ryb łososiowatych w połączeniu z wrażliwością na czynniki antropogeniczne sprawia, że kolejne populacje tych ryb są zagrożone. Spowodowało to, że stały się przedmiotem wielu analiz naukowych, dotyczących nie tylko hodowli, ale również skutecznej ochrony pul genowych, na co składają się badania z zakresu genetyki populacyjnej, rozrodu i rozwoju embrionalnego.

Gamety wykorzystane do badań pochodziły od ryb hodowanych w Zakładzie Hodowli Ryb Łososiowatych (ZHRL) Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie, w Rutkach koło Żukowa. Na potrzeby każdego z eksperymentów ikrę przeznaczoną do inaktywacji genomu jądrowego przewożono do Kliniki Onkologii i Radioterapii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie była naświetlana promieniami X z wykorzystaniem akceleratora liniowego Clinac 600. Naświetlona ikra była następnie transportowana z powrotem do wylęgarni w Rutkach, gdzie prowadzono dalsze etapy eksperymentów. Naświetloną oraz niemanipulowaną ikrę inseminowano w celu uzyskania haploidalnych androgenotów i normalnych, diploidalnych osobników (grupy kontrolne). Podczas jednego z eksperymentów nasienie przeznaczone do indukcji gynogenezy inaktywowano promieniowaniem UV, a następnie wykorzystano do aktywacji nienaświetlonych jaj. W odpowiednim momencie po inseminacji, zgodnie z warunkami ustalonymi dla danego gatunku, część naświetlanych jaj i jaj aktywowanych naświetlanym nasieniem poddawano szokowi ciśnieniowemu w celu odtworzenia diploidalnego stanu zarodków. Pozostałe jaja inkubowano, aby uzyskać osobniki haploidalne. Analizę przeżywalności potomstwa przeprowadzono na etapie zaoczkowania (pojawienia się pigmentu w oczach zarodków ryb), na etapie wylęgu oraz wylęgu pływającego, po całkowitej resorpcji woreczka żółtkowego. Dziedziczenie tylko ojcowskiego (androgeneza) lub tylko matczyne (gynogeneza) jądrowego DNA oraz homozygotyczność androgenotów i gynogenotów potwierdzono analizując markery mikrosatelitarnego DNA. Skuteczność inaktywacji jądrowego DNA oraz ploidalność komórek badano wykorzystując techniki diagnostyki cytogenetycznej. Płeć genetyczną oznaczano w oparciu o identyfikację mikroskopową chromosomów płci oraz amplifikację sekwencji DNA zlokalizowanych na chromosomie Y pstrąga tęczowego. Jądrowy DNA oraz płytki metafazowe uzyskiwano z zarodków, larw, narybku oraz z dorosłych ryb.

Planując pierwszy eksperyment zakładano, że w pozbawionych genomu jądrowego jajach jednego gatunku uda się uzyskać rozwój zarodków innego, blisko spokrewnionego gatunku. Przypuszczano również, że wykorzystanie w tym procesie jaj pochodzących od mieszańców gatunków rodzicielskich zapewni większą skuteczność tego procesu. Aby zweryfikować słuszność tej hipotezy, androgenetyczny rozwój pstrąga źródłanego (*Salvelinus fontinalis*) i palii alpejskiej (*Salvelinus alpinus*) indukowano w jajach obu gatunków oraz w jajach pobranych od hybryd pstrąga źródłanego i palii [1]. Niestety, niemal wszystkie zarodki rozwijające się w jajach pochodzących od różnych gatunków obumarły

na wczesnym etapie embriogenezy. Zaledwie jeden pstrąg źródłany rozwijający się w jajach pąlii alpejskiej przeżył do stadium zaoczkowania. W tym samym eksperymencie obserwowano prawidłowy rozwój androgenetycznych pstrągów źródłanych w jajach tego samego gatunku, a także w jajach pochodzących od hybryd. Ryby z tych grup wykłuły się i dożyły do stadium samodzielnego pobierania pokarmu [1].

Aby oszacować w jakim stopniu na skuteczność androgenozy wpływa naświetlanie jaj promieniowaniem jonizującym, porównano wyniki indukowanej androgenozy i gynogenezy pstrągów potokowych (*Salmo trutta* m. *fario*). W tym samym eksperymencie wpływ szoku ciśnieniowego na rozwój zarodków oceniono porównując przeżywalność haploidów i podwojonych haploidów [2]. W trakcie prowadzonego eksperymentu obserwowano wyższą śmiertelność osobników androgenetycznych niż gynogenetycznych, a na etapie zaoczkowania wyraźnie większą żywotność larw haploidalnych niż diploidalnych. Ponadto, analiza ploidalności androgenotów wykazała obecność wielu haploidalnych zarodków w grupach jaj eksponowanych na działanie szoku ciśnieniowego [2].

Badania haploidalnych androgenetycznych zarodków ssaków potwierdziły znacznie wyższą przeżywalność zarodków z chromosomem X od tych z chromosomem Y, co jest konsekwencją genetycznych różnic między chromosomami płci. Biorąc pod uwagę, że w przypadku niektórych gatunków ryb chromosomy płci różnią się genetyczną zawartością, niska skuteczność androgenozy może być również efektem niższej przeżywalności haploidalnych i diploidalnych osobników z chromosomami płci typu Y. Aby ocenić rolę chromosomów płci podczas rozwoju androgenetycznych pstrągów tęczowych, indukowano androgenezę wykorzystując nasienie pochodzące od zwykłych, heterogametycznych samców (XY) oraz od homogametycznych neosamców, czyli hormonalnie maskulinizowanych samic (XX). Uzyskano w ten sposób grupy androgenotów posiadających tylko chromosomy płci typu X oraz grupy, w których połowa osobników posiadała chromosomy X, a druga połowa chromosomy Y. Analiza jakości nasienia z wykorzystaniem systemu CASA wykazała, że plemniki normalnych samców i neosamców charakteryzowały się podobną ruchliwością. W trakcie prowadzonych badań zaobserwowano, że przeżywalność androgenetycznych pstrągów tęczowych w grupach złożonych tylko z samic i w grupach składających się z samic i samców utrzymywała się na bardzo zbliżonym poziomie [3, 4]. Analiza histologiczna diploidalnych androgenotów potwierdziła prawidłowy rozwój gonad u samic (XX) i samców (YY). Zaledwie u jednej

z ośmiu androgenetycznych samic zaobserwowano nietypowy obraz jajników z przerostem tkanki śródmiąższowej i oocytami w różnych stadiach dojrzałości [4].

Niska przeżywalność podwojonych haploidów jest w dużej mierze skutkiem ujawnienia się recesywnych alleli. W niniejszej pracy wykazano, że duża śmiertelność androgenotów, to także skutek uboczny naświetlania jaj promieniowaniem jonizującym i ekspozycji na subletalne dawki wysokiego ciśnienia. Duże dawki promieniowania X i gamma, co prawda niszczą matczyne genom jądrowy, ale także rozregulowują cykl komórkowy, co prowadzi do opóźnienia I podziału mitotycznego zarodków rozwijających się w napromieniowanych jajach. Szok ciśnieniowy zastosowany w odpowiednim momencie po aktywacji jaj pozwala odtworzyć diploidalny stan w komórkach androgenotów i gynogenotów. Niemniej jednak, oprócz wrzeciona podziałowego wysokie ciśnienie prawdopodobnie uszkadza też inne organelle komórkowe, czego manifestacją jest wyższa przeżywalność osobników, które nie zostały poddane jego działaniu. Niemal stuprocentowa śmiertelność zarodków w przypadku androgenezy międzygatunkowej wynika również z konfliktu między cytoplazmą jaj i genomu plemników. Wykorzystanie do indukcji androgenezy jaj pochodzących od hybryd międzygatunkowych zniwelowało te różnice i doprowadziło do uzyskania androgenetycznego wylęgu. Wykluczono natomiast jakoby na skuteczność androgenezy miały wpływ chromosomy płci. Na przykładzie pstrąga tęczowego wykazano, że różnice genetyczne między chromosomami X i Y są na tyle niewielkie, że nie wpływają na przeżywalność androgenetycznego potomstwa, a procesy dyferencjacji płci i formowania gonad przebiegają u tych ryb prawidłowo, bez względu na ich płć genetyczną.

## Literatura

- [1] 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* Mitchell 1814). *Reproduction in Domestic Animals* 49: 191-196.
- [2] Michalik O., Dobosz S., Zalewski T., Sapota M., Ocalewicz K. 2015. Induction of gynogenetic and androgenetic haploid and doubled haploid development in the brown trout (*Salmo trutta* Linneaus 1758). *Reproduction in Domestic Animals* 50: 256–262.
- [3] Michalik O., Kowalski R. K., Judycka S., Różyński R., Dobosz S., Ocalewicz K. 2016. Androgenetic development of X- and Y-chromosome bearing haploid rainbow trout embryos. *Theriogenology* 86: 1054–1060.
- [4] Michalik O., Kowalski R., Ziomek E., Hliwa P., Mieszkowska A., Różyński R., Ocalewicz K. 2017. Application of spermatozoa from neo-males (XX) to induce androgenetic development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Folia Biologica (Kraków)* 65: 71–77.