

## INDUCIRANA GINOGENEZA ŠARANA (*Cyprinus carpio*) I BIJELOG AMURA (*Ctenopharyngodon idella*) ZRAČENJEM UV-SVJETILJKOM

A. Kolak, Y. Lou, T. Treer, I. Aničić, R. Safner

### Sažetak

U radu se kratko prikazuju dosadašnja proučavanja ginogeneze riba, kao jednog od važnih područja istraživanja u ihtigenetici. Razrađuje se metoda mitotske ginogeneze u  $1,1 \tau_0$  u šarana (*Cyprinus carpio*) i mejotske ginogeneze u  $0,2-0,3 \tau_0$  u bijelog amura (*Ctenopharyngodon idella*), primijenjene u vlastitim ispitivanjima. Zaključno se konstatira znanstvena važnost ginogenetskih istraživanja, ali još i dalje veće značenje klasičnih genetskih metoda u praktičnom radu.

*Ključne riječi: ginogeneza, UV-zračenje, šaran, bijeli amur*

### UVOD

Ginogeneza je način stvaranja potomstva samo iz genoma ženke. Ona je u nekih životinja prirodan način razmnožavanja, pa tako na našim prostorima postoje populacije riba babuški sastavljene isključivo ili gotovo isključivo od ženki. Ipak, za razliku od uobičajenih oblika partenogeneze, za uspješno odvijanje prirodne ginogeneze potrebna je aktivacija ikre spermatozoidima. To se događa tako da mužjaci srodnih vrsta riba za vrijeme mrijesta izbace svoju spermu po babuškinjoj ikri, time je potaknu na početak embriogeneze, a same stanice propadnu, ne sudjelujući u oplodnji. Ova se sposobnost rabi i u umjetnom induciranju ginogeneze. Neaktivnost genoma, s mogućnošću oplodnje, postiže se UV-zračenjem, gama-zračenjem, X-zračenjem, kemikalijama,

---

Andrea Kolak, dipl. ing., mr. biol. Y. Lou, prof. dr. Tomislav Treer, mr. Ivica Aničić, mr. Roman Safner, Agronomski fakultet, Zavod za ribarstvo, pčelarstvo i specijalnu zoologiju, 10000 Zagreb, Svetošimunska 25, Hrvatska

\* Referirano na Simpoziju 32. skupa agronoma Hrvatske pod naslovom »Unapređenje ratarske, stočarske i povrćarske proizvodnje i primjena biotehnologije u poljoprivredi«, Pula 26.-29. II. 1996.

tlačnim šokom. Najdjelotvornije i najčešće primjenjivano jest UV-zračenje 500–800 J/m<sup>2</sup>.

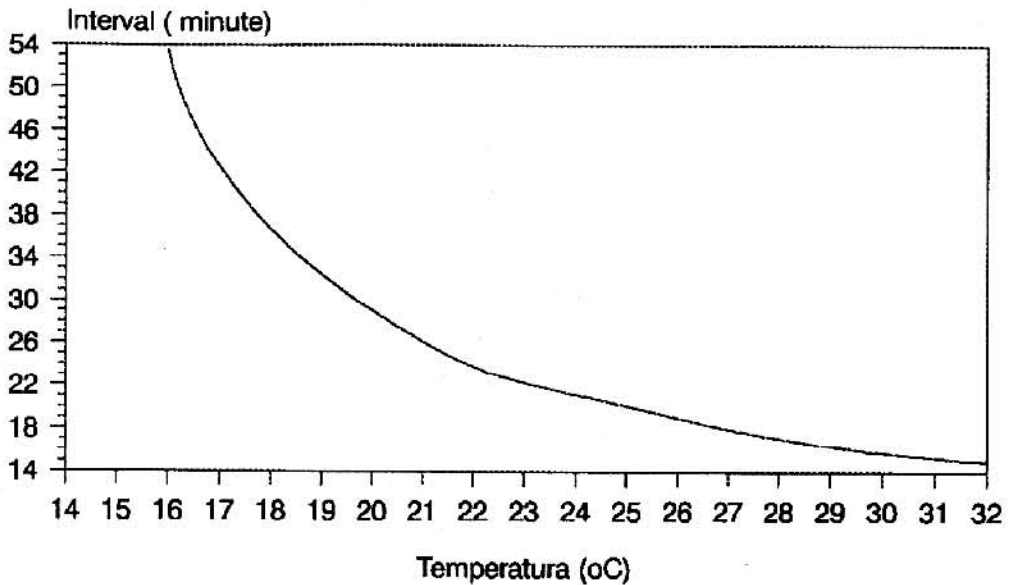
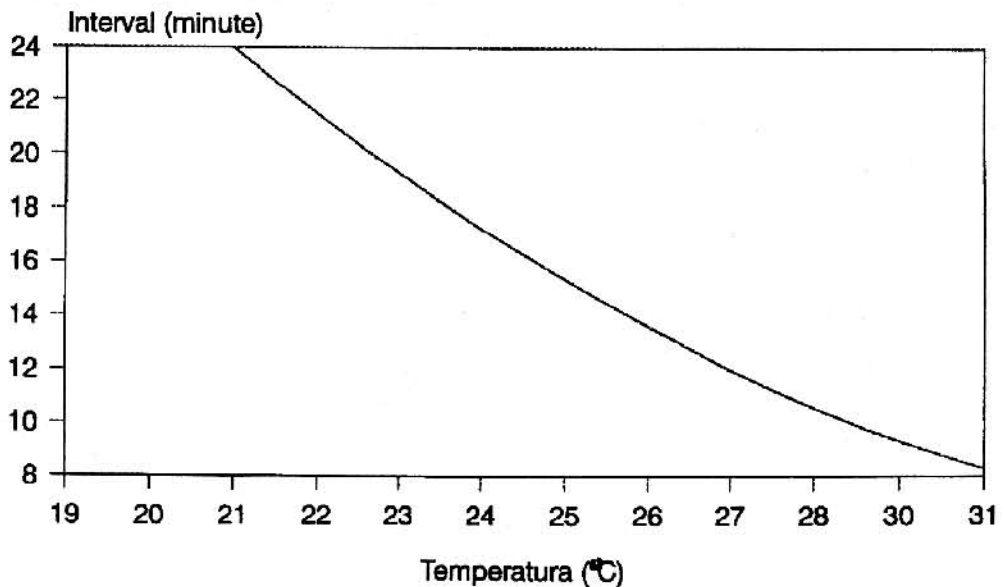
Da bi uspješno opstalo, potomstvo, u načelu, mora biti diploidno, što se postiže različitom vremenskom primjenom šoka (temperaturnog, tlačnog, kemijskog i dr.) nakon inseminacije. Postoje dva osnovna tipa ginogeneze, mitotska i mejotska. Mitotska se dobiva sprečavanjem prve diobe jajašca. Ovakvo je potomstvo homozigotno. Kod mejotske diobe djeluje se već ranije, tako da se zadrži sekundarna polocita. S obzirom na to da su ona, kao i jezgra jajeta, već prošle mejozu, ovakvo je potomstvo heterozigotno, postižući i visoki stupanj *crossing overa* i genetskih rekombinacija (Avtalion i Don 1990.). Mejotski se šok primjenjuje za indukciju ginogeneze ili triploida, a mitotski za ginogenetičku, androgenetičku ili tetraploidnu indukciju (Thorgaard, 1983., iz Rothbard S. 1991.).

Najvažniji i najosjetljiviji dio provedbe ginogeneze, kao i ostalih kromosomskih manipulacija, jest odrediti točno vrijeme primjene šoka nakon inseminacije koje će rezultirati visokim postotkom opstanka diploidnih ličinki. Dettlaff i Dettlaff prvi su 1961. uveli pojam biološke dobi ( $\tau_0$ ), koji označuje trajanje jednoga mitotskog ciklusa za vrijeme rane diobe. Ignatyeva 1975. (iz Shelton i Rothbard, 1993.) preporučuje procjenu  $\tau_0$  u tijeku sinkronoga staničnog dijeljenja. Trajanje  $\tau_0$  ovisno je o inkubacijskoj temperaturi i ističe njezinu važnost za točnu primjenu šoka. Određuje se eksperimentalno za svaku riblju vrstu. Na taj se način vrijeme primjene šoka, osim u apsolutnoj, iznosi i u relativnoj jedinici  $\tau_0$ , što omogućuje standardizaciju i usporedbu rezultata i kada su inkubacijske temperature prije šoka različite između pokusa.

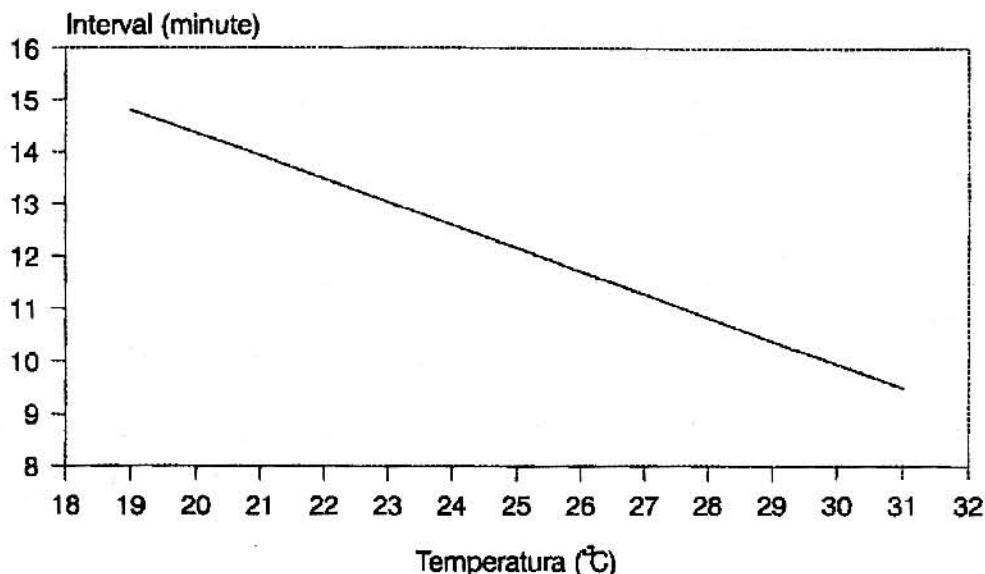
## PREGLED GINOGENETSKIH ISTRAŽIVANJA

Ginogenezu je prvi put opisao Hertwig 1911. (iz Al-Sabti, 1984.) proučavajući utjecaj ironizirajuće radijacije na žablju spermiju. Od tada je većina istraživanja, posebno u zadnjem desetljeću, motivirana ispitivanjem mogućnosti uporabe ginogeneze i poliploidije u modernome programu riblje selekcije.

Za provedbu kromosomskih manipulacija vrlo je važno znati  $\tau_0$  za određenu riblju vrstu, jer je glavni, ili jedan od glavnih ciljeva svih istraživanja odrediti točno vrijeme primjene šoka. Shelton i Rothbard (1993) iznose vrijednosti  $\tau_0$  u ovisnosti o inkubacijskoj temperaturi za šarana (*Cyprinus carpio*) na osnovi uzetih podataka te bijelog amura (*Ctenopharyngodon idella*) i crnog amura (*Mylopharyngodon piceus*) prema vlastitu istraživanju.

Grafikon 1. Mitotski interval ( $\tau_0$ ) za šarana (Shelton i Rothbard, 1993)Graph 1. Mitotic interval ( $\tau_0$ ) for common carp (Shelton and Rothbard, 1993)Grafikon 2. Mitotski interval ( $\tau_0$ ) za bijelog amura (Shelton i Rothbard, 1993)Graph 2. Mitotic interval ( $\tau_0$ ) for grass carp (Shelton and Rothbard, 1993)

Grafikon 3. Mitotski interval ( $\tau_0$ ) za crnog amura (Shelton i Rothbard, 1993)  
Graph 3. Mitotic interval ( $\tau_0$ ) for black carp (Shelton and Rothbard, 1993)



Ginogenetska se istraživanja napose provode na japanskom ukrasnom šaranu koi radi proizvodnje željenog kolorita potomstva. Uporabljene su homozigotne recesivne koi ženke i UV-zračenja spermata šarana divljeg tipa boje. Gen marker bila je koi kolorizacija. Cherfas et al. 1990. izvijestili su da je najbolje vrijeme primjene hladnog šoka, mejotske ginogeneze jedna do dvije minute nakon inseminacije, tj. u 0,03–0,07  $\tau_0$ . Nagy et al. 1978. postigli su najbolje rezultate primjenom šoka u 0,17  $\tau_0$ , a Taniguchi et al. 1986. u 0,08  $\tau_0$  (iz Cherfas et al., 1990.).

Rothbard (1991.) inducirao je mitotsku ginogenezu primjenom toplog šoka u biološkim dobima od 1,0 do 2,4 to. Visoki postoci preživljavanja (20–40%) postignuti su primjenom šoka u 1,2–1,4  $\tau_0$ , što se podudara s izvješćem Komen et al. (1991.).

Cherfas et al. (1993.) inducirali su mejotsku i mitotsku ginogenezu, te poliploidiju na šaranima linije Dor-70, komercijalno najvažnijoj liniji u Izraelu, radi ispitivanja odgovora na indukciju i mogućnost masovne proizvodnje. Gen marker bio je dominantni S gen za ljuskavost. Najefikasnije vrijeme primjene toplog šoka mejotske ginogeneze (do 29% diploidnoga ginogenetskog potomstva) postignuto je u 0,05 do 0,15  $\tau_0$ , a toplog šoka mitotske ginogeneze (do 23% diploidnoga ginogenetskog potomstva) u 1,4 do 1,5  $\tau_0$ .

Mejotsku ginogenezu toplim šokom u crnog amura proveli su Rothbard i Shelton (1993.). Koristili su se spermom heterolognih ciprinida s različitim brojem kromosoma, pogodno za ginogenetsku kontrolu, jer križanjem u prirodi ne daju živuće potomstvo. Najefikasnija primjena šoka bila je u 0,1 do 0,25  $\tau_0$ . Cherfas et al. (1990.) i Rothbard (1991.) izvijestili su o istim vrijedno-

stima za japanskog ukrasnog šarana koi. Diploidne ginogenetske ženke tretirane su sa 17  $\alpha$ -metiltestosteronom — tzv. metoda obrata spola. Dobiveni su fenotipski ginogenetski mužjaci s genotipski ženskom spermom (XX). Njihovo križanje s normalnim ženka omogućuje masovnu proizvodnju jednospolnih riba.

U provedbi ginogeneze ne može se isključiti pojava mejotskih spontano nastalih diploida, (Komen et al., 1991.), ali broj im je ograničen stupnjem spontane diploidizacije kontrolnog potomstva.

Prve ginogenetske hibride proizveli su Nagy et al. (1991.). Uspoređivali su njihovu uzgojnu vrijednost s uzgojnom vrijednosti potomstva iz nekoliko normalnih križanja komercijalno mriještenih u Mađarskoj. Nekoliko populacija ginogenetskih hibrida imalo je uzgojnu vrijednost kao najbolje potomstvo iz normalnoga križanja, što je rezultat postignuta visokoga stupnja heterozis-efekta.

Zadržavanjem sekundarne polocite prilikom normalne oplodnje potomstvo je triploidno, a sprečavanjem prve diobe tetraploidno. Triploidi se mogu još dobiti križanjem tetraploida s diploidima.

## METODE VLASTITIH ISTRAŽIVANJA

Postizanje ginogeneze u vlastitim istraživanjima temeljeno je prije svega na zračenju spermatozoida ultraljubičastom (UV) svjetiljkom, kako bi se u njima uništio genetski materijal, a sami ostali sposobni za pokretanje i time za iniciranje diobe jajašaca. U tu je svrhu upotrijebljena UV-svjetiljka od 6W, udaljena 11 cm od izloženih spermatozoida.

Istraživanje se sastojalo od dva pokusa. Prvi je započeo na Ribnjačarstvu »Draganići« 1. lipnja 1995. Spermata dvaju mužjaka ljuskavog šarana (genotip SSnn i Ssnn) zračena je i upotrijebljena odvojeno za oplodnju ikre jedne ženke maloljuskavog šarana (genotip ssnn). Nakon razrjeđivanja u 0,8%–tnom NaCl u destiliranoj vodi, radi ravnomjernosti zračenja, spermata je zračena trideset minuta. Takva dužina ekspozicije, kao optimalna, ustanovljena je pretpokusom, kada su testirani učinci različitih doza zračenja na spermu.

Oplodnja je obavljena s pomoću plodne otopine i ribnjačke vode. Inkubacijska je temperatura bila  $21 \pm 0,5$  °C, pri kojoj trajanje 1  $\tau_0$  iznosi 27 minuta, prema Shelton i Rothbard, 1993. Trideset minuta nakon inseminacije, u 1,1  $\tau_0$ , inducirana je mitotska ginogeneza primjenom toplog šoka,  $39 \pm 0,5$  °C tri minute. Zatim je proveden uobičajeni postupak inkubacije ikre. Ovaj tretman imao je dvije kontrole. U prvoj je za oplodnju upotrijebljena neozračena spermata odmah nakon uzimanja od mužjaka, a u drugoj je neozračena spermata uporabljena istodobno kada i ozračena, tj. pola sata nakon uzimanja, držana na sobnoj temperaturi.

Drugi je pokus započeo u mrestilištu »Topličica« 14. lipnja 1995. Dio je sperme ljuskavog šarana bez zračenja upotrijebljen za oplodnju ikre dviju ženki

bijelog amura, a dio je zračen na opisani način. U prvom slučaju nastojao se šaranskom spermom inicirati embrionalni razvoj ikre bijelog amura, slično kao što se događa babuški u prirodi, a u drugom to potvrditi i uništenjem kariotipa šarana. Inkubacijska je temperatura bila  $22 \pm 0,5$  °C, pri kojoj trajanje  $1 \tau_0$  iznosi 22 minute. Četiri do šest minuta nakon inseminacije, u  $0,2-0,3 \tau_0$  inducirana je mejotska ginogeneza toplim šokom. Dio je ikre izložen temperaturnom šoku od  $41 \pm 0,5$  °C jednu minutu, a dio od  $38 \pm 0,5$  °C dvije minute. I ovaj je pokus imao dvije već opisane kontrole, uz dodatnu treću kojom je obavljena uobičajena oplodnja te ikre spermom mužjaka bijelog amura. Daljnji postupak inkubacije ikre proveden je uobičajenom metodom u inkubacijskim posudama.

U oba su pokusa stalno praćeni inkubacija oplodene ikre, te razvoj ličinki i mladunaca u laboratoriju Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Tako su, provedbom ovih postupaka i proizvodnjom dvaju ginogenetskih amura, stečena potrebna praktična iskustva iz ovog područja genetike riba.

## PERSPEKTIVA

Razvoj sofisticirane opreme i metoda u današnjoj znanosti donio je i mnogo novih mogućnosti u razvoju genetike riba. Osim ginogenezi, velika se pažnja posvećuje i poliploidiji te kloniranju.

Ginogenezom se postiže uniseksualna populacija koja je dragocjena kada je reprodukcija nepoželjna. Tako nam može poslužiti kao primarno oruđe za kontrolu neželjene reprodukcije egzotičnih riba, u svrhu nenarušavanja biološke ravnoteže i zaštite vodenog staništa.

Mitotskom ginogenezom mogu se proizvesti potpuno homozigotne linije, tzv. klonovi, što omogućuje uzgoj koi šarana željenog kolorita. Svaki potomak mitotske ginogeneze može poslužiti kao potencijalni predak klon-linije. Smatra se da je budućnost koi uzgoja u proizvodnji ženskih klonova i »seks-obratnih« klon mužjaka za dobivanje daljnjih generacija klonova željenog kolorita (Rothbard, 1991.).

U komercijalnom uzgoju šarana Nagy et al. (1992.) prvi su put, križanjem ginogenetskih linija, proizveli ginogenetske hibride. Ustanovili su postojanje velike varijabilnosti uzgojne vrijednosti, koja je rezultat aditivnog dijela genotipa, što omogućuje postizanje visokoga stupnja heterozis-efekta u križanju selekcioniranih ginogenetskih linija. Izogeno potomstvo dobiveno ginogenezom može se upotrijebiti za mapiranje gena (Taylor, 1978, iz Bongers et al., 1994.); zbog ujednačenosti omogućuje standardizaciju eksperimentalnih istraživanja i smanjenje broja riba na kojima se provode istraživanja.

Poliploidna kromosomska manipulacija značajna je za biljni svijet, osim proizvodnje triploida. Triploidi su sterilni, što rezultira bržim rastom usmjerenim samo na masu, i što je važnije, regulira se njihov željeni broj prema

potrebama i u skladu s mogućnostima vodenoga staništa, a to je značajno za športski ribolov.

Navedene su neke mogućnosti uporabe kromosomskih manipulacija, ali se većinom ostalo na razini fundamentalnih istraživanja.

Iz svega navedenog može se zaključiti da ginogeneza, kao i druga citigenetska istraživanja riba, za akvakulturu još uvijek imaju prije svega znanstvenu važnost, a tek svojim daljnjim razvojem mogu dobiti i veću praktičnu ulogu. To znači da klasičan genetski rad u ribarstvu i dalje zadržava svoje pravo značenje. Ovo potvrđuje i pisano priopćenje koje smo nedavno dobili od našeg prijatelja, jednog od najboljih svjetskih ihtiogenetičara, autora više od stotinu vrhunskih radova i knjiga, dr. Douglasa Tavea (1995.), koje glasi: Genetsko je inženjerstvo sexy, jer je visokotehnološko, no ono je trenutno nepotrebno i gubitak novca. Još ćemo dugo mnogo veća dostignuća postizati u tradicionalnim uzgojnim istraživanjima.

## Summary

### INDUCED GYNOGENESIS OF COMMON CARP (*Cyprinus carpio*) AND GRASSCARP (*Ctenopharyngodon idella*) BY UV-LAMP IRRADIATION

In this paper the short review of fish gynogenesis, as one of the important fields of research in ichthyogenetics, is presented. Two methods of own research are described. One of them is mitotic gynogenesis of common carp by 1,1  $\tau_0$ . Another one is meiotic gynogenesis of grasscarp by 0,2–0,3  $\tau_0$ . The scientific importance of gynogenetic researches is stated, but also the value of classical genetic methods, which are still more important in practical work.

*Key words:* gynogenesis, UV irradiation, common carp, grasscarp

## LITERATURA

- Al-Sabti, K. (1984): Sexdetermining genes in tilapia: a model of genetic recombination emerging from sex ratio results of three generations of diploid gynogenetic *Oreochromis aureus*. J. Fish. Biol., 37, 167–173.
- Bongers, A. B. J., Abo-Hashema, K., Bremmer, I. H., Eding, E. H., Komen, J., Richter, C. J. J., (1994): Androgenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using UV irradiation in a synthetic ovarian fluid and heat shocks. Aquaculture, 122, 119–132.
- Cherfas, N. B., Gomelsky, B., Peretz, Z., Ben-Dom, N., Hulata, G., Moav, B. (1993): Induced gynogenesis and polyploidy in the Israeli common carp line Dor-70. The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgheh, 45, 59–72.

- Cherfas, N. B., Kozinsky, O., Rothbard, S., Hulata, G. (1990): Induced diploid gynogenesis and triploidy in ornamental (koi) carp, *Cyprinus carpio* L. The Israeli Journal of Aquaculture—Bamidgeh, 42, 3–9.
- Dettlaff, T. A., Dettlaff, A. A. (1961): On relative dimensionless characteristics of the development duration in embryology. Arch. Biol. (Liege), 72, 1–16.
- Komen, J., Bongers, A. B. J., Richter, C. J. J., van Muiswinkel, W. B., Huisman, E. A. (1991): Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.) II. The production of homozygous gynogenetic clones and F1 hybrids. Aquaculture, 92, 127–142.
- Nagy, A., Csanyi, V., Bakos, J., Bercsenyi, M. (1992): Utilization of gynogenesis and sex-reversal in commercial carp breeding: growth of the first gynogenesis hybrids. Fisheries Research Institute.
- Rothbard, S., Shelton, W. L. (1993): Gynogenesis in the black carp, *Mylopharyngodon piceus*. The Israeli Journal of Aquaculture—Bamidgeh, 45, 82–88.
- Rothbard, S., (1991): Induction of endomitotic gynogenesis in the nishiki-goi, japanese ornamental carp. The Israeli Journal of Aquaculture—Bamidgeh, 43, 145–155.
- Hörstgen-Schwark, G. (1993): Production of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Aquaculture, 112, 25–37.
- Shelton, W. L., Rothbard, S. (1993): Determination of the developmental duration (xx) for ploidy manipulation in carps. The Israeli Journal of Aquaculture—Bamidgeh, 45, 73–81.
- Tave D. (1995): Pismoeno priopćenje.

Primljeno 29. 2. 1996.