

Wydział Oceanografii i Geografii, Uniwersytet Gdański

Impact of selected physical and biological factors on efficiency
of gynogenesis and androgenesis in rainbow trout
(*Oncorhynchus mykiss*)

Wpływ wybranych czynników fizycznych i biologicznych na
skuteczność gynogenezy i androgenezy pstrąga tęczowego
(*Oncorhynchus mykiss*)

Marcin Polonis

Ph.D. thesis written under the supervision of

dr hab. Konrad Ocalewicz, prof. UG



Institute of Oceanography
University of Gdańsk

October 2021

Streszczenie

Wstęp

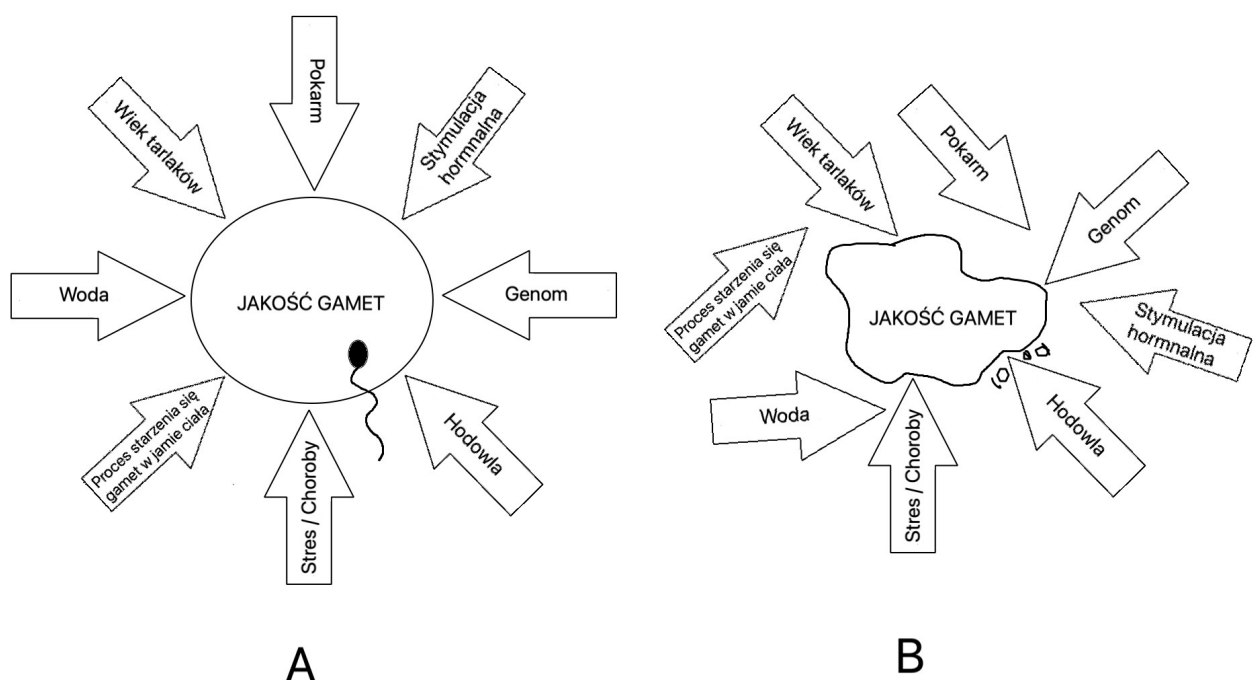
Koniec dwudziestego i początek dwudziestego pierwszego wieku przyniósł wiele alarmujących doniesień o słabej kondycji zasobów ryb w morzach i oceanach wynikającej z nadmiernej eksploatacji rybackiej. W samym Morzu Śródziemnym blisko 90% stad ryb znajduje się poniżej stabilnego poziomu co grozi zachwianiem całego ekosystemu. Aby sprostać rosnącemu popytowi na ryby oraz chronić przełowione populacje ważnych gospodarczo gatunków ryb, od lat 90. XX w. zaczęto mocno rozwijać akwakulturę, czyli hodowlę organizmów wodnych przy użyciu technik pozwalających na zwiększenia ich produkcji ponad naturalną zdolność środowiska. Gwałtowny rozwój akwakultury przyczynił się do opanowania produkcji wielu gatunków ryb i bezkręgowców wodnych w warunkach kontrolowanych. Szacuje się (Dane wg FAO), że do roku 2030, 65% konsumowanych globalnie organizmów wodnych będzie pochodziło z akwakultury. Liderami w Europie pod względem akwakultury są Norwegia, Wielka Brytania, Hiszpania, Francja oraz Włochy. Polska z około 40 tys. ton ryb (głównie ryby łososiowate i karpowate) hodowanych w warunkach akwakultury rocznie jest znaczącym producentem w tym obszarze w Unii Europejskiej. Najważniejszym gatunkiem w krajowej akwakulturze i jednym z najistotniejszych w Europie jest pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss*), którego produkcja w UE wynosi ok. 240 tys. ton z czego ponad 8% to pstrągi pochodzące z Polski.

Współczesna akwakultura swój gwałtowny rozwój zawdzięcza nie tylko rosnącemu popytowi na ryby i skorupiaki, ale także nowoczesnym technologiom pozwalającym na opracowanie wysoko wydajnych pasz dla ryb, skutecznych leków i szczepień czy biotechnikom umożliwiającym rozród ryb w warunkach kontrolowanych. Postęp, który dokonuje się w sferze genetyki, biologii molekularnej i biotechnologii w ostatnich dziesięcioleciach także wpływa na kształt dzisiejszej akwakultury. I tak już od kilku lat w badaniach podstawowych i aplikacyjnych z zakresu ichtiologii i akwakultury wykorzystuje się biotechnologiczne metody rozrodu ryb takie jak androgenеза i gynogenеза (Komen and Thorgaard, 2007). Techniki te wymagają inaktywacji gamet poprzez ich naświetlanie wysokimi dawkami promieniowania jonizującego lub UV, które niszczą jądro DNA. W przypadku

inseminacji inaktywowanych komórek jajowych normalnym nasieniem otrzymuje się androgenetyczne haploidalne zarodki, zaś produkcja gynogenetycznych haploidalnych zarodków sprowadza się do aktywacji jaj plemnikami ze zniszczonym jądrowym DNA. Następnie, haploidalne zygoty są poddawane na działanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego lub subletalnej temperatury w celu zatrzymania pierwszego podziału jądra komórkowego, zduplikowaniu ojcowskich (androgeneza) lub matczyńskich (gynogeneza mitotyczna) chromosomów i powstania tak zwanych podwojonych haploidów (ang. Doubled Haploids; DHs), które są w pełni homozygotyczne (Pandian and Koteeswaran, 1998). W przypadku gynogenezy istnieje również drugi wariant tego procesu, gynogeneza mejotyczna. W tym przypadku haploidalne zygoty ekspozycja na działanie udaru środowiskowego nieco wcześniej, tuż po inseminacji. W efekcie, dochodzi do zatrzymania wyrzucenia drugiego ciała kierunkowego i odtworzenia diploidalnej liczby chromosomów, a uzyskane w ten sposób osobniki są heterozygotyczne (Komen and Thorgaard, 2007).

Haploidalne androgenetyczne i gynogenetyczne zarodki oraz podwojone haploidy są wykorzystywane w badaniach dotyczących funkcji poszczególnych genów i wpływu recesywnych alleli na rozwój osobniczy (Zhang et al., 2014). Ponadto, homozygotyczność podwojonych haploidów sprawia, że genomy takich organizmów łatwiej się sekwencjonuje (Felip et al., 2001). Dziedziczenie wyłącznie matczyńskich lub ojcowskich chromosomów sprawia, że procesy androgenezy i gynogenezy wykorzystuje się w badaniach dotyczących genetycznej determinacji płci u ryb (Komen and Thorgaard, 2007). Androgeneza, a także gynogeneza są metodami, które znajdują swoje zastosowanie w akwakulturze w programach selekcyjnych, produkcji izogenicznych stad ryb czy stad złożonych z osobników jednej płci, a także linii klonalnych (Hulata, 2001; Billard, 1992). Dodatkowo, androgeneza umożliwia ochronę i odtwarzanie pul genowych populacji, linii, a nawet gatunków ryb (androgeneza międzygatunkowa) z przechowywanego w ciekłym azocie nasienia (Babiak et al., 2002). Androgenetyczny i gynogenetyczny rozwój indukuje się głównie w przypadku gatunków ryb (czasami także bezkręgowców wodnych) istotnych z punktu widzenia akwakultury, a więc głównie ryb łososiowatych (Salmonidae) (Chourrout, 1984), karpowatych (Cyprinidae) (Komen et al., 1991), a także dorady (*Sparus aurata*) (Peruzzi and Chatain, 2000), labraksa (*Dicentrarchus*

labrax) (Francescon et al., 2004), turbota (*Scophthalmus maximus*) (Piferrer et al., 2004) czy halibuta (*Hippoglossus hippoglossus*) (Tvedt, 2006). Niestety, szersze zastosowanie obu metod ma swoje ograniczenia, w tym między innymi relatywnie niską przeżywalność androgenetycznego i gynogenetycznego potomstwa, która jest związana z ujawnieniem się letalnych alleli (Komen and Thorgaard 2007), ale prawdopodobnie także ograniczoną jakością samiczych gamet wykorzystanych w tych badaniach. Biorąc pod uwagę, że jaja ryb podczas indukowanej androgenezy i gynogenezy ekspozowane są na działanie szkodliwych czynników fizycznych, ikra wykorzystywana podczas tych zabiegów powinna być jak najwyższej jakości, czyli charakteryzować się przede wszystkim prawidłową morfologią, wysoką przeżywalnością po zapłodnieniu oraz prawidłowo rozwijającymi się w niej zarodkami (Aegerter and Jalabert, 2004; Migaud et al., 2013). Wiele czynników ma wpływ na jakość samiczych gamet u ryb, w tym między innymi kondycja tarlaków czy warunki środowiskowe w jakich przebywają ryby przed tarłem (jakość wody, jakość pokarmu, warunki hodowli, narażenie na stres). Zbyt długie przebywanie komórek jajowych w jamie ciała czy stymulacja hormonalna stosowana w celu wywołania owulacji oraz stres wywołany przez warunki hodowli znacząco obniżają ich zdolności do zapłodnienia i prawidłowego rozwoju zarodków (Aegerter and Jalabert, 2004; Migaud et al., 2013). W ostatnim czasie potwierdzono, że na potencjał rozwojowy jaj ma wpływ także jakość matczynego RNA, zgromadzonego w oocytach podczas oogenezy, która to jakość jest wypadkową czynników środowiskowych działających na tarlaku i genomu samicy (Aegerter et al., 2005) (Rysunek 1).



Rysunek 1. Czynniki decydujące o jakości gamet u ryb. A - równowaga; B - brak równowagi.

Wczesne etapy rozwoju embrionalnego u ryb są całkowicie zależne od matczynej mRNA, które jest zdeponowane w oocytach podczas oogenezy i reguluje serię synchronicznych podziałów komórkowych przed aktywacją genomu zygotycznego (Kane and Kimmel, 1993; Sullivan et al., 2015). Prowadzone przez zespół dr hab. Konrada Ocalewicza badania matczynego transkryptomu z wykorzystaniem metody sekwencjonowania nowej generacji ujawniły znaczące różnice w ekspresji kilkudziesięciu genów w jajach pochodzących od różnych samic pstrąga tęczowego (Gurgul et al., 2018). W związku z powyższym założono, że gamety od różnych samic mogą różnić się profilem transkryptomycznym i posiadać różny potencjał rozwojowy po gynogenetycznej aktywacji. W przypadku wybranych gatunków ryb, takich jak np. troć (*Salmo trutta fario*) czy golec zwyczajny (*Salvelinus alpinus*), wysoka jakość jaj może manifestować się poprzez równomierne rozmieszczenie kropli tłuszczowych, natomiast gromadzenie się kropli na jednym z biegunów komórek jajowych wskazuje, że komórki te mają ograniczone kompetencje rozwojowe (Mansour et al., 2007; Mansour et al., 2008; Ciereszko et al., 2009). Przeżywalność zarodków rozwijających się w takich jajach jest zazwyczaj dużo niższa, a odsetek zdeformowanych osobników, które się z nich wykluły wyższy (Aegerter and Jalabert, 2004).

Mając na uwadze, że czynniki zewnętrzne mają kluczowy wpływ na jakość komórek jajowych ryb, należy domniemywać, że zarówno napromieniowywanie gamet jak i ekspozycja zapłodnionej ikry na działanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, mogą negatywnie wpływać na przeżywalność zarodków, rozwijających się w tak traktowanych ziarnach ikry. Zastosowania zbyt niskich dawek promieniowania UV podczas naświetlania nasienia w trakcie gynogenezy prowadzi do niepełnej inaktywacji jądrowego DNA w plemnikach. Może to skutkować pojawieniem się fragmentów ojcowskich chromosomów w komórkach osobników gynogenetycznych. Fragmenty chromosomów mogą destabilizować gynogenetyczny genom i tym samym obniżać przeżywalność nosicieli pozostałości ojcowskich chromosomów (Chourrout, 1984, Michalik et al., 2015). Jednym z mechanizmów zapobiegających międzygatunkowej hybrydyzacji jest usuwanie wyłącznie ojcowskich chromosomów z komórek zarodków hybryd. W związku z powyższym,

wykorzystanie do indukcji rozwoju gynogenetycznego gamet pochodzących od różnych gatunków może rozwiązać problem retencji fragmentów naświetlanych chromosomów. Niewykluczone jest też, że stosowanie promieniowania jonizującego do naświetlania samiczych gamet podczas androgenezy oraz ekspozycja haploidalnych zarodków na działanie szoku ciśnieniowego w celu diploidyzacji może prowadzić z kolei do destabilizacji cytoszkieletu komórki i upośledzenia funkcjonowania mikrotubul odpowiedzialnych między innymi za przemieszczanie się kropli tłuszczowych w cytoplazmie, a także do zniszczenia matczynego RNA (Parker et al., 2014; Aegerter et al., 2005). Dodatkowo, promieniowanie jonizujące wykorzystywane do inaktywacji jądrowego DNA w ziarnach ikry podczas androgenezy jest jednym z głównych źródeł reaktywnych form tlenu (RFT) (Samarin et al., 2018), których nadwyżka może prowadzić do obniżenia jakości jaj ryb i spadku przeżywalności rozwijających się w takich jajach zarodków. Niewykluczone, że w odpowiedzi na wzrost poziomu RFT, w komórkach dochodzi do zwiększenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) czy też peroksydaza glutationowa (GPx), które stanowią enzymatyczny system przeciwutleniający.

Cel naukowy badań oraz podsumowanie wyników

W szerokim ujęciu, celem niniejszej pracy było oszacowanie wpływu wybranych czynników fizycznych i biologicznych na skuteczność gynogenezy i androgenezy pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), zaś cele szczegółowe obejmowały uzyskanie gynogenetycznych pstrągów tęczowych wykorzystując do aktywacji jaj inaktywowanego promieniowaniem UV nasienia troci wędrowniej (*Salmo trutta*) [Publikacja 1], analizę rozmieszczenia kropli tłuszczowych w cytoplazmie ziaren ikry eksponowanych na działanie promieniowania jonizującego w trakcie indukowanej androgenezy oraz ocenę ich potencjału rozwojowego [Publikacja 2], identyfikację genów kandydackich wpływających na skuteczność procesu indukowanej gynogenezy [Publikacja 3] oraz ocenę aktywności enzymów antyoksydacyjnych w jajach naświetlanych promieniowaniem jonizującym podczas androgenezy [Publikacja 4].

Doświadczenia zmierzające do realizacji zamierzonych celów prowadzono w latach 2015-2019 za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na

Zwierzętach w Gdańsku (no.28/2015). Gamety wykorzystane podczas badań pochodziły od pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*) i troci wędrowej (*Salmo trutta*) ze stad hodowanych w Zakładzie Hodowli Ryb Łososiowatych (ZHRŁ) w Rutkach (Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie). W przypadku badań dotyczących androgenezy, ikrę transportowano do Kliniki Onkologii i Radioterapii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie była naświetlana promieniowaniem X wykorzystując w tym celu akcelerator liniowy TrueBeam. Następnie, napromieniowana ikra była przewożona do ośrodka w Rutkach, aby przeprowadzić kolejne etapy eksperymentów. W celu wyprodukowania haploidalnych androgenotów oraz diploidalnych osobników, których genom złożony był z chromosomów obu rodziców (grupy kontrolne), napromieniowana oraz niemanipulowana ikra była inseminowana. W przypadku gynogenezy, niemanipulowane jaja były aktywowane nasieniem, które przed inseminacją naświetlano promieniowaniem UV w celu inaktywacji ojcowskich chromosomów. Androgenetyczne oraz gynogenetyczne haploidalne zygoty poddawano działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w celu odtworzenia diploidalnego stanu zarodków (Michalik et al., 2015). Podczas trwania doktoratu dwukrotnie przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem gynogenezy i androgenezy. Przeżywalność gynogenotów, androgenotów i ryb z grup kontrolnych oraz odsetek zdeformowanych larw, a także rodzaj deformacji (badane podczas wczesnych etapów ontogenezy) stanowiły podstawowe parametry przy ocenie jakości ikry wykorzystanej w badaniach i skuteczności manipulacji genomowych. Ponadto, ziarna ikry badano pod kątem rozmieszczenia kropli tłuszczowych, wartości pH płynu owaryjnego, aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz ilości i jakości matczynego transkryptomu. Homozygotyczność androgenetycznych oraz gynogenetycznych osobników potwierdzano analizując mikrosatelitarny DNA (Kaczmarczyk and Kaczor, 2013; Rexroad et al., 2002; Rexroad et al., 2001; Rexroad and Palti, 2003). Skuteczność inaktywacji jądrowego DNA oraz ploidalność komórek badano wykorzystując techniki diagnostyki cytogenetycznej (Ocalewicz et al., 2013). Ruchliwość aktywowanych i napromieniowywanych plemników wykorzystywanych w kolejnych doświadczeniach badano pod mikroskopem.

Pomimo bardzo wysokiej jakości gamet wykorzystanych w poszczególnych doświadczeniach, przeżywalność androgenetycznych i gynogenetycznych zarodków i wylęgu była znacząco niższa niż w grupach kontrolnych [Publikacje 1,2,3,4].

Ponadto analiza rozwoju larw wykazała, że nieprawidłowości w ich budowie występują znacząco częściej wśród homozygotycznych androgenetycznych podwojonych haploidów niż u heterozygotycznych ryb z grupy kontrolnej [Publikacja 2].

Hybrydy pstrąga tęczowego i troci wędrownej są nieżywotne ze względu na duże międzygatunkowe różnice w budowie i organizacji genomu. Stąd, do indukcji gynogenetycznego rozwoju pstrąga tęczowego wykorzystano dla porównania nasienie pstrąga tęczowego i troci. Analiza cytogenetyczna zarodków hybryd wykazała międzyosobnicze, a także wewnątrzosobnicze zróżnicowanie liczby chromosomów oraz obecność fragmentów chromosomów. Przeżywalność gynogenetycznych zarodków i larw pstrąga tęczowego była nieco wyższa w grupach z zastosowaniem homologicznego nasienia ($p > 0.05$). W komórkach gynogenetycznych pstrągów tęczowych, które wykluły się z jaj aktywowanych napromieniowanym homologicznym i heterologicznym nasieniem nie stwierdzono obecności fragmentów chromosomów [Publikacja 1].

Aby oszacować wpływ promieniowania jonizującego na rozmieszczenie kropli tłuszczowych porównano ziarna ikry pochodzące od czterech samic przed oraz po ekspozycji na promieniowanie X podczas indukcji androgenetycznego rozwoju. Większość przeanalizowanych ziaren ikry przed napromieniowaniem wykazała względnie równomierny rozkład kropli tłuszczowych. W grupach jaj, które podlegały napromieniowaniu zaobserwowano zwiększoną liczbę gamet charakteryzujących się nierównomiernym rozmieszczeniem kropli tłuszczowych. Ponadto, wśród ryb rozwijających się w ziarnach ikry eksponowanych przed zapłodnieniem na działanie promieniowania jonizującego zaobserwowano wyższy odsetek osobników z wadami rozwojowymi. Tylko nieliczne androgenoty przeżyły do etapu wylęgu pływającego [Publikacja 2].

W kolejnym eksperymencie, zaobserwowano istotne różnice w przeżywalności gynogenetycznych zarodków rozwijających się w jajach pochodzących od różnych samic. Ikra pochodząca od jednej z czterech badanych samic wykazała szczególnie predyspozycje do gynogenetycznego rozwoju. Zarodki rozwijające się w tych jajach charakteryzowały się niemal 10 krotnie wyższą przeżywalnością w porównaniu do embrionów rozwijających się w jajach pobranych od pozostałych samic. Analiza porównawcza transkryptów jaj o różnych kompetencjach rozwojowych po aktywacji

naświetlanym nasieniem, pozwoliła zidentyfikować 46 genów, których ekspresja była istotnie wyższa w jajach charakteryzujących się wysoką przeżywalnością rozwijających się w nich gynogenetycznych pstrągów. Analiza funkcjonalna transkryptów tych genów wykazała ich zaangażowanie między innymi w procesy związane z różnicowaniem się komórek, wczesny rozwój embrionalny, metabolizm trójglicerydów, biosyntezę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, a także proces starzenia się komórek [Publikacja 3].

Promieniowanie jonizujące jest jednym z głównych czynników powodujących uszkodzenia i stres komórkowy poprzez zaburzenie integralności DNA oraz powstawanie ROS. W związku z powyższym, planując ostatni eksperyment założono, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych w jajach naświetlanych promieniowaniem jonizującym podczas androgenozy może ulec zmianie. Ponadto przypuszczano, że wartość pH płynu owaryjnego po jego naświetlaniu obniży się. Przeżywalność, aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym SOD, CAT i GPx, a także pH płynu owaryjnego badano w jajach nienapromieniowanych i napromieniowanych, pochodzących od czterech samic. Przeżywalność zarodków androgenetycznych rozwijających się w jajach pochodzących od różnych samic znacznie się wahała, a różnice te były istotne. Zaobserwowano również, że Ikra pstrąga tęczowego pochodząca od różnych samic wykazywała znaczne różnice w aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Jaja od samicy, która wykazała najwyższe kompetencje rozwojowe do androgenozy, charakteryzowały się również podwyższoną aktywnością enzymów SOD, CAT i GPx. Przeprowadzone badania potwierdziły też w większości przypadków zmiany w aktywności enzymatycznej pomiędzy ikłą nienaświetlaną i naświetlaną pochodzącą od tej samej samicy. Wartość pH płynu jajnikowego każdej z samic wynosiła ponad 8, zarówno przed jak i po napromieniowaniu [Publikacja 4].

W niniejszej pracy doktorskiej wykazano, że inaktywowane promieniami UV nasienie troci, może być z powodzeniem wykorzystane do aktywacji komórek jajowych w procesie gynogenezy pstrąga tęczowego [Publikacja 1]. Zmiany obserwowane w napromieniowanych jajach wskazują, że ekspozycja ikry pstrąga tęczowego na promieniowanie jonizujące podczas androgenozy prowadzi do zwiększenia liczby gamet z nierównomiernym rozkładem kropli tłuszczowych.

Ponadto, androgenetyczne zarodki pstrąga tęczowego rozwijające się w napromieniowanych jajach rzadko się wykluwają, a ich znaczna część posiada liczne deformacje ciała co wynika z ujawnienia się recesywnych alleli, ale także wskazuje na obniżony potencjał rozwojowy napromieniowanych gamet samiczych [Publikacja 2]. Geny, które wykazały zwiększoną ekspresję w jajach, w których zaobserwowano wyraźnie podwyższoną przeżywalność gynogenetycznych pstrągów tęczowych, można uznać za geny kandydujące, których ekspresja wpływa na skuteczność procesu indukowanej gynogenezy. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują geny związane z wczesnym rozwojem embrionalnym, gospodarką lipidową, a także procesem starzenia się komórek [Publikacja 3]. Duża zmienność aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz znaczne różnice w przeżywalności androgenotów rozwijających się w jajach pochodzącym od różnych samic sugerują o wiele większy wpływ matczynek czynników genetycznych niż samego promieniowania jonizującego na jakość ikry i prawidłowy rozwój androgenotów. Ponadto, należy wykluczyć wpływ promieniowania jonizującego na równowagę kwasowo-zasadową płynu owaryjnego, który pierwotnie uznano za ważny w kontekście przeżywalności androgenetycznych pstrągów [Publikacja 4].

Bibliografia

- 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(1-4), 59-71. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.019>
- Aegerter, S., Jalabert, B., & Bobe, J. (2005). Large scale real-time PCR analysis of mRNA abundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 72(3), 377-385. <https://doi.org/10.1002/mrd.20361>
- Babiak, I., Dobosz, S., Goryczko, K., Kuzminski, H., Brzuzan, P., & Ciesielski, S. (2002). Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology*, 57(4), 1229-1249. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00631-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00631-3)
- Billard, R. (1992). Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, 100(1-3), 263-298. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90385-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90385-X)
- Chourrout, D. (1984). Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout: production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36(1-2), 111-126. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90058-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90058-9)
- Ciereszko, A., Wojtczak, M., Dietrich, G. J., Kuźmiński, H., & Dobosz, S. (2009). A lack of consistent relationship between distribution of lipid droplets and egg quality in hatchery-raised rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 289(1-2), 150-153. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.032>
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., & Piferrer, F. (2001). Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica*, 111(1), 175-195. <https://doi.org/10.1023/A:1013724322169>
- Francescon, A., Libertini, A., Bertotto, D., & Barbaro, A. (2004). Shock timing in mitogynogenesis and tetraploidization of the European sea bass

- Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 236(1-4), 201-209.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.018>
- Gurgul, A., Pawlina-Tyszko, K., Bugno-Poniewierska, M., Szmatoła, T., Jasielczuk, I., Dobosz, S., & Ocalewicz, K. (2018). Transcriptome analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs subjected to the high hydrostatic pressure treatment. *International Journal of Genomics*, 2018, 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2018/5197126>
- Hulata, G. (2001). Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, 111(1), 155-173. <https://doi.org/10.1023/A:1013776931796>
- Kaczmarczyk, D., & Kaczor, A. (2013). New multiplex PCR assays for estimating genetic diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by polymorphism of microsatellite DNA. *Environmental Biotechnology*, 9, 19–24.
- Kane, D. A., & Kimmel, C. B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development*, 119(2), 447-456.
<https://doi.org/10.1242/dev.119.2.447>
- Komen, H., & Thorgaard, G. H. (2007). Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: a review. *Aquaculture*, 269(1-4), 150-173.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.009>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90015-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90015-Y)
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., & Patzner, R. A. (2007). Distribution of lipid droplets is an indicator for egg quality in brown trout, *Salmo trutta fario*. *Aquaculture*, 273(4), 744-747.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.027>
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., McNiven, M. A., & Richardson, G. F. (2008). Morphological characterization of Arctic char, *Salvelinus alpinus*, eggs subjected to rapid post-ovulatory aging at 7 C. *Aquaculture*, 279(1-4), 204-208. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.014>
- 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*, Linnaeus 1758). *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), 256-262. <https://doi.org/10.1111/rda.12480>
- Migaud, H., Bell, G., Cabrita, E., McAndrew, B., Davie, A. et al. (2013). Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Reviews in Aquaculture*, 5, 194–223. <https://doi.org/10.1111/raq.12025>
- Ocalewicz, K., Kuzminski, H., Pomianowski, K., & Dobosz, S. (2013). Induction of androgenetic development of the brook charr (*Salvelinus fontinalis*) × Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) hybrids in eggs derived from the parental species. *Reproductive Biology*, 13(2), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.03.002>
- Pandian, T. A., & Koteeswaran, R. (1998). Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 384(1), 167-243. <https://doi.org/10.1023/A:1003332526659>
- Parker, A. L., Kavallaris, M., & McCarroll, J. A. (2014). Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 153. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00153>
- Peruzzi, S., & Chatain, B. (2000). Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture*, 189(1-2), 23-37. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00355-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00355-0)
- Piferrer, F., Cal, R. M., Gómez, C., Álvarez-Blázquez, B., Castro, J., & Martínez, P. (2004). Induction of gynogenesis in the turbot (*Scophthalmus maximus*): effects of UV irradiation on sperm motility, the Hertwig effect and viability during the first 6 months of age. *Aquaculture*, 238(1-4), 403-419. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.009>
- Rexroad 3rd, C. E., Coleman, R. L., Martin, A. M., Hershberger, W. K., & Killefer, J. (2001). Thirty-five polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Genetics*, 32(5), 317-319. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2001.0730b.x>

- Rexroad III, C. E., & Palti, Y. (2003). Development of ninety-seven polymorphic microsatellite markers for rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 132(6), 1214-1221. <https://doi.org/10.1577/T02-086>
- Rexroad III, C. E., Coleman, R. L., Gustafson, A. L., Hershberger, W. K., & Killefer, J. (2002). Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries. *Marine Biotechnology*, 4(1), 12-16. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0058-6>
- Samarin, A. M., Samarin, A. M., & Policar, T. (2019). Cellular and molecular changes associated with fish oocyte ageing. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 619-630. <https://doi.org/10.1111/raq.12249>
- Sullivan, C. V., Chapman, R. W., Reading, B. J., & Anderson, P. E. (2015). Transcriptomics of mRNA and egg quality in farmed fish: some recent developments and future directions. *General and comparative endocrinology*, 221, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.012>
- Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J., McGowan, C., & Reith, M. (2006). Gynogenesis and sex determination in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 252(2-4), 573-583. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.042>
- Zhang H, Tan E, Suzuki Y, Hirose Y, Kinoshita S, Okano H, Kudoh J, Shimizu A, Saito K, Watabe S, Asakawa S (2014). Dramatic improvement in genome assembly achieved using doubled-haploid genomes. *Scientific Reports*, 4(1), 1-5. <https://doi.org/10.1038/srep06780>