

# POLYPLOÏDIE BIJ DIEREN

Aantal woorden: 10280

**Tine Matthysen**

Studentennummer: 01705521

Promotor: Prof. dr. Luc Peelman

Promotor: Prof. dr. Mario Van Poucke

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2019– 2020



*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.*

*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.*

## Preambule

De coronacrisis heeft geen invloed gehad op de uitvoering van deze masterproef.

## Voorwoord

Ik zou even de tijd willen nemen om enkele mensen te bedanken. Allereerst bedank ik graag Prof. Dr. Peelman voor de goede ondersteuning bij het maken van deze literatuurstudie. Dankzij zijn tips over welke aanpak best gehanteerd kon worden en ook literaire en inhoudelijke aanpassingen en suggesties, heb ik dit werk tot een goed einde kunnen brengen. Daarnaast wil ik ook Prof. Dr. apr. Croubels bedanken om mij te helpen aan de juiste informatieve bronnen te komen betreft chemische stoffen en Prof. Dr. Decostere en Prof. Dr. ir. Bossiers om mij in contact te brengen met personen met ervaring in de aquacultuur. Tenslotte mogen ook mijn ouders, broer, zus en medestudenten niet vergeten worden, met hen heb ik gesprekken gevoerd die extra hebben aangezet tot denken en nieuwe dingen opzoeken, hun steun tijdens dit gehele werk was onmisbaar.

Titelblad

Vrijwaringsclausule

Preambule

Voorwoord

Inhoudsopgave

1. Lijst met afkortingen .....	6
2. Samenvatting .....	6
3. Inleiding .....	6
4. Literatuurstudie.....	7
4.1. Wat is Polyploidie? .....	7
4.2. Polyploidie in het planten- en dierenrijk .....	9
4.2.1. Volledige genoomduplicatie (VGD) in de evolutie .....	9
4.2.2. Polyploidie bij planten.....	11
4.2.3. Polyploidie bij dieren.....	11
4.3. Polyploidie en aquacultuur .....	13
4.3.1. Aquacultuur: een groeiende sector.....	13
4.3.2. Aquacultuur en polyploidie: Een goede combinatie .....	14
4.4. Productie van triploïde vissen.....	15
4.4.1. Algemene principes .....	15
4.4.2. Voor- en nadelen .....	16
4.5. Methoden om triploïdie te induceren bij vissen .....	17
4.5.1. Fysische methoden.....	17
4.5.2. Chemische methoden.....	20
4.5.3. Vergelijking tussen de methoden .....	21
4.5.4. Endocriene feminisatie .....	22
4.5.5. Determinatie van de graad van ploïdie .....	23
4.6. Toepassingen voor triploïdie in aquacultuur.....	24
5. Discussie .....	25
6. Conclusie.....	26
7. Referentielijst.....	27

## 1. Lijst met afkortingen

GHS	Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals
GMO	Genetisch Gemodificeerd organisme (Engelse vertaling: Genetically Modified Organism)
NOR	Nuclear Organizing Region
PEG	Polyethyleenglycol
VGD	Volledige Genoomduplicatie
qPCR	kwantitatieve Polymerase Chain Reaction
6-DMAP	6-dimethylaminopurine

## 2. Samenvatting

Polyploidie is de aanwezigheid van een extra chromosomenset. Er zijn 2 vormen van polyploidie, namelijk autopolyploidie en allopolyploidie die beiden hun eigen ontstaansmechanismen hebben. Volledige genoomduplicaties liggen aan de basis van het ontstaan van verschillende planten- en diersoorten en hebben dus een grote rol gespeeld in de evolutie. De gevolgen van polyploidie die plant en dier gemeen hebben zijn 'gene redundancy', heterosis en gedaalde fertiliteit. Daarnaast is bij planten en invertebraten ook gigantisme aanwezig, wat niet teruggevonden wordt bij vertebraten. Bij dieren wordt polyploidie waargenomen in verschillende invertebraten taxa en ook bij vissen, amfibieën en reptielen. Er zijn verschillende hypothesen over waarom polyploidie meer voorkomt bij planten dan bij dieren, maar geen van deze hypothesen op zichzelf geeft een sluitende verklaring. In de aquacultuur wordt triploidie geïnduceerd bij oesters en verschillende vissoorten. Bij vissen wordt triploidie geïnduceerd door een directe artificiële schok toe te dienen aan een zygote, waarbij meestal gebruik gemaakt wordt van druk. Daarnaast wordt dit gecombineerd met een indirecte feminisatiemethode en de ploïdiegraad wordt gecontroleerd met behulp van flow cytometrie of karyotypering. Triploidie bij vissen kent verschillende toepassingen. Het wordt gebruikt in de productie van consumptievissen (voornamelijk zalmachtigen), als preventiemiddel voor reproductie bij ontsnapte vissen, voor bevoorrading bij sportvisserij en als biologische onkruidbestrijders. Voor de verdere introductie van triploidie in de aquacultuur moet er aandacht besteed worden aan het financiële plaatje, alsook de consumentenperceptie. Tenslotte kan er ook verder onderzoek gedaan worden naar andere toepassingsmogelijkheden voor triploïde vissen.

## 3. Inleiding

Triploïde organismen zijn organismen die een chromosomenset extra hebben ten opzichte van hun diploïde soortgenoten. Deze toestand kan worden teruggevonden bij zowel planten als dieren en heeft verschillende gevolgen. Het gegeven triploïdie kan niet enkel in de natuur teruggevonden worden, maar kan ook geïnduceerd worden. De reden waarom men dit doet is wegens de specifieke eigenschappen die hiermee gepaard gaan. De belangrijkste eigenschap die triploïde vissen bezitten is steriliteit. Het is deze steriliteit die in de aquacultuur heel wat voordelen kent waarvan handig gebruik gemaakt wordt. In de literatuur worden echter zeer veel verschillende methoden beschreven om triploïdie te induceren bij vissen. Door dit veelvoud aan informatie is het niet vanzelfsprekend om een overzicht te behouden over al deze methoden. Het productieproces is belangrijk, maar daarnaast moet ook het nut ervan bekeken worden. De vraag is dan ook wat het nut is van triploïde vissen, waarom worden ze geproduceerd en wat zijn de toepassingsmogelijkheden nu en in de toekomst.

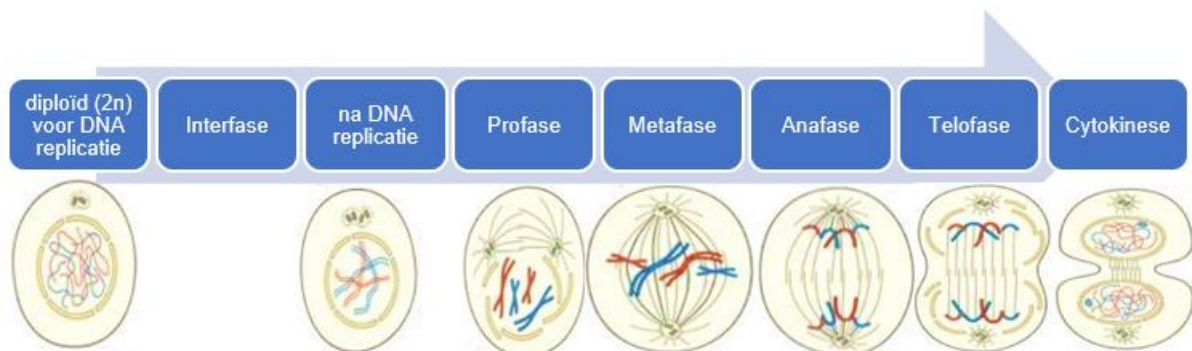
Om het gehele verhaal te begrijpen zal eerst nagegaan worden hoe polyploidie ontstaat, waar het voorkomt en wat de gevolgen zijn. Daarna wordt de rol van triploidie in de aquacultuur verder uitgelicht. Het uiteindelijke doel van deze literatuurstudie is na te gaan welke verschillende methoden aanwezig zijn voor de inductie van triploidie bij vissen en deze ook te vergelijken met elkaar. Verder wordt bekeken welke onderdelen nog essentieel zijn in het productieproces van triploidie. Tenslotte worden toepassingen in het heden en de toekomst onderzocht.

## 4. Literatuurstudie

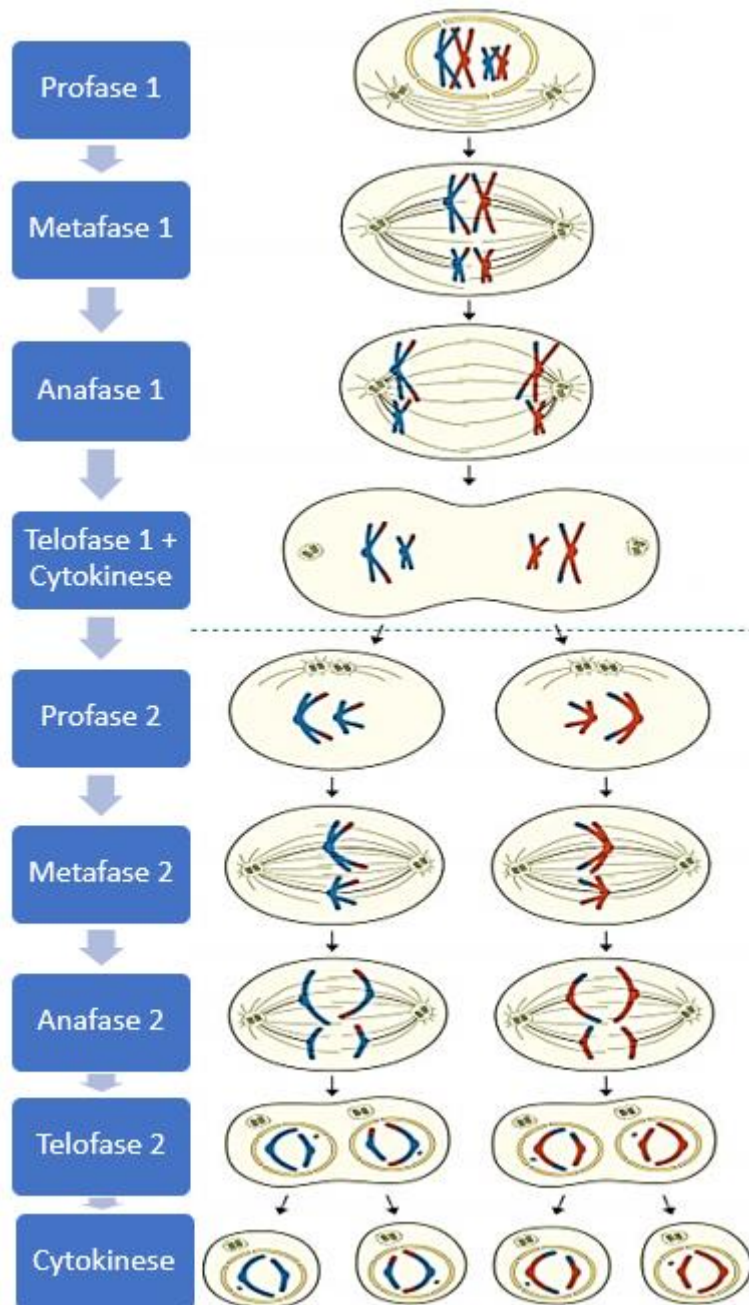
### 4.1. Wat is Polyploidie?

Polyploïden zijn organismen met één of meer extra chromosomensets in vergelijking met het aantal sets dat het meest frequent teruggevonden wordt in de natuur voor een bepaald species (Piferrer et al., 2009). Er wordt een onderscheid gemaakt tussen 2 vormen van polyploidie, namelijk autopolyploidie en allopolyploidie. Beide vormen van polyploidie kunnen op natuurlijke of artificiële wijze ontstaan.

Autopolyploidie is genoomduplicatie binnenin een species (Wertheim et al., 2013) die ontstaat door veranderingen in het mitotisch of meiotisch proces (figuur 1 en 2). Er kunnen 3 mechanismen aan de basis gesteld worden voor het ontstaan van natuurlijk autopolyploidie. Een eerste mechanisme is de verstoring van de gametogenese door cytogenetische veranderingen van de meiose (Piferrer et al., 2009). Dit kan zijn bijvoorbeeld (1) door pre-meiotische endoduplicatie van de chromosoomset waardoor met een groter chromosomenaantal gestart en dus ook geëindigd wordt na de meiose, (2) suppressie van de eerste en/of tweede meiotische deling waarbij de cel en dus ook de chromosomen niet in twee verdeeld worden of (3) door non-disjunctie van mitotische chromosomen in de anafase van embryonale deling waarbij de zusterchromatiden niet van elkaar gescheiden zullen worden. Een tweede mechanisme is de onderdrukking van de tweede meiotische deling door cytoskeletale veranderingen in post-ovulatoire, oudere oöcyten (Piferrer et al., 2009). Post-ovulatoire oöcyten verouderen door verlengde opslag, de autotriploidie die hierdoor ontstaat wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het falen van de extrusie van het secundaire poollichaampje (Flajshans et al., 2007). Het derde mechanisme is de verstoring van het gameetfertilisatieproces door bijvoorbeeld polyspermie (Piferrer et al., 2009), waarbij meerdere spermacellen de oöcyt binnendringen en zo ook meer chromosomen binnenbrengen. Het induceren van artificiële polyploidie komt verder aan bod.



Figuur 1: Overzicht van de mitose. Naar D'Haeninck et al., 2009.



Figuur 2: Overzicht van de meiose. Naar D'Haeninck et al., 2009.

Allopolyploidie is hybridisatie van 2 verschillende species (Wertheim et al., 2013) die ontstaat door reproductief contact tussen beide species. Reproductief contact tussen ver verwante soorten van lagere vertebraten (vissen, amfibieën en reptielen) kan soms zorgen voor veranderingen van de gametogenese in hun nageslacht. Dit is geassocieerd met veranderingen in reproductie en vaak ook met polyploidie (Ráb et al., 2007). De alternatieve manieren van reproductie in deze gevallen zijn (1) parthenogenese waarbij een onbevuchte oöcyt herenigd wordt met een poollichaampje en zo embryogenese ondergaat (Erenpreisa et al., 2015), (2) gynogenese waarbij een spermacel de celdeling van een oöcyt activeert, maar de nakomeling enkel nucleair DNA bezit van de vrouwelijke ouder (Avisé, 2015) en (3) hybridogenese waarbij een oöcyt en spermacel versmelten om embryonale ontwikkeling te initiëren, maar waarbij kiemcellen van de nakomelingen daarna een abnormale meiose ondergaan waardoor de resulterende gameten geen paternale genen dragen (Avisé, 2015).



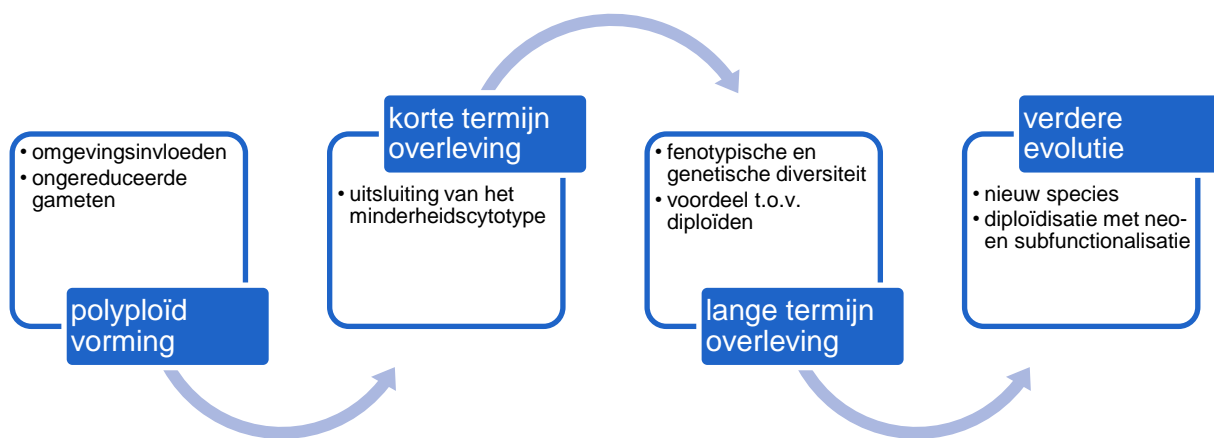
## 4.2. Polyploidie in het planten- en dierenrijk

### 4.2.1. Volledige genoomduplicatie (VGD) in de evolutie

Bij planten en dieren is polyploidisatie een wijdverspreid gegeven en een belangrijk mechanisme van speciatie (Song et al., 2012). Verschillende species werden gevormd door volledige genoomduplicatie tijdens de evolutie. Bij de planten zijn de bedektzadigen hier een goed voorbeeld van (Van de Peer et al., 2017). Bij de dieren is bijvoorbeeld de hele familie van *Salmonidae* afkomstig van een tetraploid (Song et al., 2012).

#### VGD in de evolutie van het plantenrijk

In planten is polyploidie een wijdverspreid en gekend gegeven. De verschillende vormen van polyploidie zijn essentieel in plantspeciatie en -diversificatie. De vraag is niet “is dit species polyploid?”, maar “hoeveel rondes van VGD zijn voorgekomen in de ancestrale lijn van dit taxon?” (Renny-Byfield en Wendel, 2014). Om te begrijpen hoe polyploidie zich gevestigd heeft in het plantenrijk is het belangrijk te weten hoe polyploidie ontstaat bij planten en hoe polyploïden op korte en lange termijn kunnen overleven (een overzicht wordt weergegeven in figuur 3).



Figuur 3: Een overzicht van hoe polyploïden in het plantenrijk gevormd worden en hoe ze overleven op korte en lange termijn met een weergave van de belangrijkste punten hierbij.

Er zijn 2 grote pathways gekend die aanleiding geven tot polyploidie in planten: somatische verdubbeling en vorming van ongereduceerde reproductieve cellen (Sattler et al., 2015), waarvan deze laatste veruit de belangrijkste is.

Eens een polyploid gevormd is, moet deze eerst op korte termijn kunnen overleven, vooraleer deze zich op lange termijn kan gaan vestigen en uitbreiden. Een obstakel is de uitsluiting van het minderheidscytotype, waarbij een nieuwe polyploid ook een polyploïde partner moet vinden om te kunnen voortplanten. Bij planten gaat polyploidisatie echter vaak gepaard met de overgang van kruisbestuiving naar zelfbestuiving of van seksuele naar asexuele reproductie (Van de Peer et al., 2017). Polyploïden bezitten daarnaast een verhoogde genetische variatie die invloed kan hebben op hun morfologie, fysiologie en ecologie en deze veranderingen kunnen op hun beurt interspecies interacties beïnvloeden en zo zorgen voor reproductieve isolatie van diploïden en polyploïden (Van de Peer et al., 2017).

Oude VGD zijn veel zeldzamer dan nieuwe polyploïden, dit wil zeggen dat maar een minderheid van de polyploïden die de korte termijn overleven, gevestigd geraken op de lange termijn. VGD zorgt voor meer fenotypische en genetische diversiteit, maar dit is enkel nuttig als deze diversiteit ook een voordeel biedt ten opzichte van de diploïden. In stabiele ecosystemen waar diploïden goed gedijen, hebben polyploïden geen voordelen en zullen deze dus ook veel moeilijker gevestigd raken op lange termijn (Oberlander et al., 2016). Daarentegen kunnen polyploïden zich wel vestigen in niches die voordien onbezet waren, omdat hun polyploidie kan gezorgd hebben voor de ontwikkeling van een nieuwe fenotypische eigenschap waardoor zij wel geschikt zijn om deze niche te bewonen (Van de Peer et al., 2017). Een goed voorbeeld hiervan is het ontstaan van de bedektzadigen (Angiosperma) via VGD, dit zijn planten die gekenmerkt zijn door bloemen. Bepaalde voordien lege niches kunnen nu bevolkt

worden door deze bedektzadigen omdat zij met behulp van hun nieuw kenmerk wel kunnen overleven in deze niche. De genetische diversiteit zorgt ook voor hogere tolerantie tegen een grotere range van ecologische en omgevingscondities, waardoor VGD ook een rol kan spelen in het vermijden van extinctie. Een duidelijk voorbeeld hiervan is het voorkomen van een golf van VGD vlak bij de overgang van Krijt naar Paleogeen. Deze overgang werd gekenmerkt door een meteorinslag gevolgd door een impact-geïnduceerde verhoogde vulkanische activiteit, waardoor klimaatverandering en -opwarming zorgde voor extinctie van 60-70% van alle planten en dierlijk leven, inclusief alle niet-aviaire dinosauriërs (Van de Peer et al., 2017). Een belangrijke bedenking die hierbij ook gemaakt moet worden is dat de productie van ongereduceerde gameten verhoogt door externe stimuli zoals stress, bijvoorbeeld een warmere omgeving, wat helemaal in dit verhaal past.

Naast het overleven op lange en korte termijn heeft polyploidie of VGD ook een belangrijke rol in de verdere evolutie. Enerzijds kan polyploidie resulteren in de vestiging van een nieuw species (neopolyploïden). Anderzijds kan polyploidie gezien worden als een meer voorbijgaande toestand. Om polyploidie stabiel te maken, kunnen genoomreorganisaties voorkomen, een onderdeel hiervan is diploïdisatie. Diploïdisatie is een geleidelijke conversie van polyploidie naar diploidie door genetische veranderingen die gedupliceerde genen en chromosomen onderscheiden, waarbij veel, of de meeste, gedupliceerde genen verloren gaan. De gedupliceerde genen die aanwezig blijven kunnen uiteindelijk neofunctionalisatie of subfunctionalisatie ondergaan (Wertheim et al., 2013).

#### VGD in de evolutie van het dierenrijk

Volledige genoomduplicatie is wereldwijd gekend als een belangrijk onderdeel van de evolutie bij planten, maar het is minder erkend als drijvende kracht voor dierlijke diversificatie (Mable et al., 2011). Niettemin zijn er reeds 3 rondes van VGD geïdentificeerd in de evolutie van dieren. De eerste duplicatie gebeurde in het evolutionair proces van *Cephalochordata* naar kaakloze vertebraten. De tweede duplicatie gebeurde na de divergerende evolutie van *Myxiniidae* (Slijmprikken) en *Petromyzontiformes* (Prikken) (Song et al., 2012). De derde ronde van duplicatie vond plaats tijdens de vroege evolutie van de lijn van *Straalvinnigen* (Volf, 2005) na hun afsplitsing van de *Tetrapoda*.

In alle grote taxonomische diergroepen bestaat polyploidie, maar voornamelijk bij vissen en amfibieën komt het redelijk frequent voor (Wertheim et al., 2013). Hogere vertebraten tolereren geen polyploidie, bij zoogdieren en vogels zijn veranderingen in ploïdie fataal, waarbij polyploïden reeds vroeg in de ontwikkeling sterven (Song et al., 2012).

De punten die aangehaald werden bij VGD in de evolutie van het plantenrijk kunnen ook terug aangehaald worden als het gaat om polyploidie bij vissen en amfibieën. Ongereduceerde gameten kunnen net zoals bij planten aanleiding geven tot het ontstaan van polyploidie. De externe reproductie en fertilisatie bij vissen en amfibieën stelt zygoten bloot aan temperatuurstress, wat verhoogde productie van ongereduceerde gameten kan promoten (Mable et al., 2011). Op korte termijn krijgen ook vissen en amfibieën te kampen met de uitsluiting van het minderheidscytotype. Bij amfibieën is assortatieve paring aanwezig door akoestische herkenning van dezelfde ploïdiegraad (Mable et al., 2011). Daarnaast doet ongeveer 60% van de polyploïden aan uniseksuele reproductie, waardoor een species kan uitbreiden zonder aanwezigheid van een seksuele partner (Zhou en Gui, 2017). Er is geen sterk bewijs dat polyploïde vissen of amfibieën op dit moment in meer extreme omgevingen of bredere ecologische ranges bestaan dan hun diploïde voorgangers (Mable et al., 2011). De ontstane polyploïden kunnen vervolgens nieuwe diploïden of neopolyploïden worden door diploïdisatie en differentiatie. Deze nieuwe diploïden en neopolyploïden kunnen dan nieuwe polyploïden vormen waardoor de species verder worden verrijkt (Song et al., 2012).

#### 4.2.2. Polyploidie bij planten

Polyploïde planten bezitten andere eigenschappen dan hun diploïde soortgenoten. Deze eigenschappen zorgen ervoor dat polyploidie in bepaalde plantsoorten zeer gewild is.

Polyploidie bij planten zorgt voor een toename van celgrootte (door een grotere DNA inhoud) zonder een verlies in celtaal, dit resulteert in een toename van de grootte van het blad (Zhang et al., 2019) of andere organen. Men spreekt van het 'Gigas effect'. Als dit gigantisme voorkomt in organen van commercieel belang, dan is het een waardevol kenmerk dat gebruikt kan worden voor gewasverbetering (Sattler et al., 2016).

De genoomduplicatie die is gebeurd bij polyploïden heeft op niveau van het genoom nog 2 duidelijke gevolgen, namelijk 'gene redundancy' en heterosis. 'Gene redundancy' beschermt polyploïden tegen het schadelijke effect van mutaties omdat recessieve allelen gemaskeerd worden door dominante wild-type allelen (Comai, 2005). Het geeft daarnaast ook de mogelijkheid tot neofunctionalisatie of subfunctionalisatie van genen. Heterosis verwijst naar de biomassa, grootte, groeisnelheid en/of fertiliteit die superieur zijn in de hybride nakomelingen in vergelijking met de ouders (Chen, 2010). Heterosis zorgt er dus voor dat polyploïden krachtiger zijn dan hun diploïde voorgangers (Comai, 2005). Daarnaast is ook heterozygositeit gerelateerd met krachttoename in bepaalde plantsoorten (Sattler et al., 2016).

Polyploidie en fertiliteit zijn sterk aan elkaar gekoppeld. Hier kan op verschillende manieren gebruik van gemaakt worden. De gedaalde fertiliteit die typisch gezien wordt bij polyploïden zorgt er enerzijds voor dat polyploidie beperkt is tot gewassen die gekweekt worden voor hun vegetatieve organen en diegene met vegetatieve vermeerdering (Sattler et al., 2016). Anderzijds gaat polyploidie gepaard met minder tot geen zaad in het fruit, een goed voorbeeld hiervan is de watermeloen, dit is dan weer een eigenschap die door de consument gewenst is. Daarnaast kan polyploidie ook gebruikt worden om de vruchtbaarheid van steriele hybriden te herstellen (Sattler et al., 2016). Hybriden tussen ver uit elkaar gelegen taxa zijn vaak steriel omdat er een tekort is aan homologe chromosomen die kunnen paren tijdens de meiose. Polyploïdisatie die leidt tot duplicatie van elk parentaal genoom, zorgt ervoor dat elk chromosoom een identieke partner heeft om mee te paren in de meiose (Hegarty et al., 2008). Tenslotte kan polyploidie ook dienen als een brug voor genetische overdracht als directe kruising tussen 2 species niet mogelijk is. Bij deze strategie wordt transitionele vruchtbare allopolyploidie gebruikt om genen over te dragen tussen 2 species met een verschillende ploïdie (Sattler et al., 2016).

#### 4.2.3. Polyploidie bij dieren

##### Gevolgen

Het effect dat polyploidie heeft op het genoom en de cel is bij dieren en planten zeer vergelijkbaar. De eigenschappen zijn voordien reeds aangehaald bij planten (zie 4.2.2. Polyploidie bij planten), hier wordt nog eens terug kort overlopen hoe het met deze eigenschappen zit bij polyploïde dieren. Net zoals bij planten is er ook bij dieren een toename in celgrootte. Het gevolg van die toegenomen celgrootte is echter verschillend bij vertebraten en invertebraten. De invertebraten zullen net zoals de planten gigantisme vertonen (Fankhauser, 1945; Otto en Whitton, 2000; Mable et al., 2011). De vertebraten daarentegen zullen naast een toename in celgrootte, ook reductie in celtaal hebben waardoor ze gelijkaardige orgaan- en lichaamsgrootte bewaren ten opzichte van de diploïden (Otto en Whitton, 2000; Piferrer et al., 2009; Mable et al., 2011; Song et al., 2012) en er dus geen sprake is van het 'Gigas effect'. 'Gene redundancy' en heterosis met al hun gevolgen zijn identiek aanwezig bij polyploïde planten en dieren (Comai, 2005). Tenslotte wordt ook de fertiliteit beïnvloed door polyploidie. Voordien werd reeds aangehaald dat polyploidie vaak gepaard gaat met een nieuwe, veranderde vormen van reproductie, later zal ook de fertiliteit bij triploïde vissen nog in meer detail besproken worden.

### Voorkomen

Polyploidie is vastgesteld binnen een heel wijde waaier aan dierentaxa, zowel bij vertebraten als bij invertebraten wordt het teruggevonden. Bij de invertebraten is polyploidie gedocumenteerd bij Insecta (insecten) (Otto et al., 2000), Crustacea (kreeftachtigen), Mollusca (weekdieren), Annelida (ringwormen), Platyhelminthes (platwormen) en nog enkele andere invertebraten (Gregory et al., 2005). Bij de vertebraten is polyploidie vastgesteld bij vissen, amfibieën en reptielen (tabel 1). Bij zoogdieren en vogels zijn veranderingen in ploëdie typisch fataal, waarbij polyploïden sterven vroeg in de ontwikkeling (Song et al., 2012). Polyploidie is eenmalig beschreven bij de viscacharat, *Tympanoctomys barrerae* (Gallardo et al., 1999), nadien werd gezien dat er een hoge aanwezigheid was van repetitieve sequenties, maar geen bewijs voor de aanwezigheid van VGD (Evans et al., 2017). Ontdekking van nieuwe polyploïden blijft zeldzaam, enerzijds omdat weinig onderzoekers ernaar zoeken, anderzijds ook wegens de moeilijkheden om polyploïden te identificeren. Er zijn verschillende methoden om polyploidie vast te stellen (zie 3.5.4. Determinatie van de graad van ploëdie), maar geen enkele methode werkt voor alle groepen. De hoofdmethode die gebruikt wordt is dus verschillend tussen de verschillende groepen, maar geen enkele van de gebruikte technieken is onbetwistbaar, waardoor controversen over ploëdie-status vaak onopgelost blijven. De huidige hoeveelheid geïdentificeerde polyploïden kan dus een sterke onderschatting zijn van de werkelijke hoeveelheid (Mable et al., 2011).

Tabel 1: Weergave van de gedocumenteerde natuurlijke polyploïden. Bij de vissen en reptielen worden de Ordes weergegeven (behalve de Tetrapoda), bij de amfibieën de Families.

Vissen (Le Comber et al, 2004)	Amfibieën (Otto et al., 2000)	Reptielen (Otto et al., 2000)
<ul style="list-style-type: none"><li>- Perciformes</li><li>- Cyprinodontiformes</li><li>- Atheriniformes</li><li>- Salmoniformes</li><li>- Siluriformes</li><li>- Cypriniformes</li><li>- Semionotiformes</li><li>- Acipenseriformes</li><li>- Lepidosireniformes</li><li>- Tetrapoda</li></ul>	<p>Orde: Anura</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Alsodidae</li><li>- Arthroleptidae</li><li>- Bufonidae</li><li>- Ceratophryidae</li><li>- Dicroglossidae</li><li>- Hylidae</li><li>- Leiopelmatidae</li><li>- Leptodactylidae</li><li>- Lymnodynastidae</li><li>- Microhylidae</li><li>- Odontophrynidae</li><li>- Pipidae</li><li>- Pyxicephalidae</li><li>- Ranidae</li><li>- Strabomantidae</li></ul> <p>Orde: Urodela</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Ambystomatidae</li><li>- Plethodontidae</li><li>- Salamandridae</li><li>- Sirenidae</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Squamata</li><li>- Chelonia</li></ul>

### Waarom is polyploidie minder frequent bij dieren dan bij planten?

Polyploidie wordt veel minder frequent gezien bij dieren dan bij planten. Voordien werd reeds aangehaald dat er een onderschatting aanwezig kan zijn van de werkelijke hoeveelheid polyploïden bij dieren, maar daarnaast zijn er ook een heel aantal hypothesen aanwezig om te verklaren waarom polyploidie bij dieren minder gezien wordt. In het algemeen kan echter gesteld worden dat er veel hypothesen naar voren gebracht zijn, maar dat er nog geen enkele een volledige verklaring kan bieden.

Een hypothese die kan verklaren waarom geen polyploidie bij zoogdieren en vogels teruggevonden kan worden is een algemene verstoring in de ontwikkeling (Otto, 2007). De genoomreorganisatie om een gebalanceerd genoom te behouden na polyploidisatie kan moeilijker zijn, omdat (1) er ingewikkelde netwerken van geneninteracties zijn, die variëren tussen terminaal gedifferentieerde cellen in verschillende weefsels en organen, (2) het dierlijk lichaamsplan niet flexibel is en (3) gescheiden geslachten typisch zijn voor zoogdieren en vogels waarbij onder andere dosiscompensatie een belangrijke rol speelt (Wertheim et al., 2013). Er is echter geen algemene consensus over deze aangehaalde punten. De toename van celgrootte die gepaard gaat met polyploidie kan zorgen voor veranderingen in fysiologische processen en ontwikkelingsprocessen die vertrouwen op zorgvuldig gebalanceerde regulatoire systemen. Daartegenover staat dat dieren omgaan met deze toename in celgrootte door het celtaal te reduceren om zo een gelijkaardige orgaan- en lichaamsgrootte te behouden, planten kunnen dit niet. Het feit dat dieren hun celtaal kunnen reguleren maakt hen dan misschien net beter geschikt om te kunnen omgaan met veranderingen in gendosering en ontwikkelingspathways (Mable, 2004). De dosiscompensatie die nodig is voor geslachtsbepaling is een aanvaardbaar punt voor zoogdieren en vogels, maar kan niet doorgetrokken worden voor het volledige dierenrijk omdat er verschillende manieren zijn van geslachtsdeterminatie waar zeker nog niet alles over gekend is (Mable, 2004).

Er zijn ook verschillende hypothesen die trachten te verklaren waarom polyploidie voornamelijk bij vissen en amfibieën voorkomt, terwijl het zeldzaam is bij andere vertebraten. Er wordt vooral gekeken naar eigenschappen die vissen en amfibieën gemeen hebben met elkaar. De 43 gekende polyploïde amfibieën zijn verdeeld over 12 families, met het grootste aantal (19) in de familie van de *Pipidae*. Bij vissen zijn er families die volledige polyploïd zijn. Er zijn enkele factoren aanwezig die de vorming van polyploïden bij vissen en amfibieën vergemakkelijken. Een eerste factor is dat ze makkelijker ongereduceerde gameten vormen (Mable et al., 2001), wat een van de mechanismen is voor het ontstaan van polyploidie (zie 3.1. Wat is polyploidie?). Een tweede factor is dat de kans groter is om leefbare gameetcombinaties te vormen bij vissen en amfibieën, omdat ze een groot aantal gameten produceren (Mable, 2004 en Mable et al., 2011), de bevruchting extern gebeurt en ze gemeenschappelijk kweken. De derde factor is dat ze zich voortplanten in zoetwater. De omgevingsfluctuaties zijn sterker in zoetwater dan in zoutwater (Mable et al., 2011), deze fluctuaties kunnen mee zorgen voor het ontstaan van ongereduceerde gameten.

#### 4.3. Polyploidie en aquacultuur

##### 4.3.1. Aquacultuur: een groeiende sector<sup>1</sup>

Visproductie en visconsumptie heeft een sterke groei gekend de afgelopen decennia en ook aquacultuur is hier een steeds grotere rol in gaan spelen. In 2016 werd er globaal 171 miljoen ton vis, crustacea, mollusca en andere aquatische dieren geproduceerd (exclusief aquatische zoogdieren, reptielen, zeewier en andere aquatische planten). De aquacultuur stond in voor 47% van deze productie. Sinds eind de jaren 80 is de visserijproductie relatief stabiel gebleven en is het vooral de toename in aquacultuur die verantwoordelijk is voor de groei in voorziening voor humane consumptie. Naast de groei van de sector is ook de consumptie toegenomen. Over een tijdsspanne van 1961-2016 kende de visconsumptie een jaarlijkse groei van 3,2% dewelke groter is dan de groei van de wereldpopulatie (1,6%). In 2015 had de wereldpopulatie een visconsumptie van 20,2kg/jaar/capita, in Europa ligt deze waarde hoger, namelijk 22,5kg/jaar/capita. Aquacultuur zal in de toekomst nog verder in belang toenemen omdat er nood is aan een manier van productie die minder druk uitoefent op de natuurlijke vispopulaties. Voor zeevisserij wordt bijvoorbeeld opgevolgd welk effect de visserij heeft op de biologische duurzaamheid van de vispopulaties. In 2015 was de fractie van visvoorraad die zich binnen het biologische duurzaamheidsniveau bevindt 66,9%, in 1974 was dit nog 90%. Dit wil zeggen dat 33,1% van de visvoorraden bevestigd worden op biologisch niet haalbare niveaus, waardoor deze populaties in de problemen komen. Door meer in te zetten op aquacultuur kan de visserij gereduceerd worden, waardoor er minder druk wordt gezet op deze natuurlijke visvoorraden.

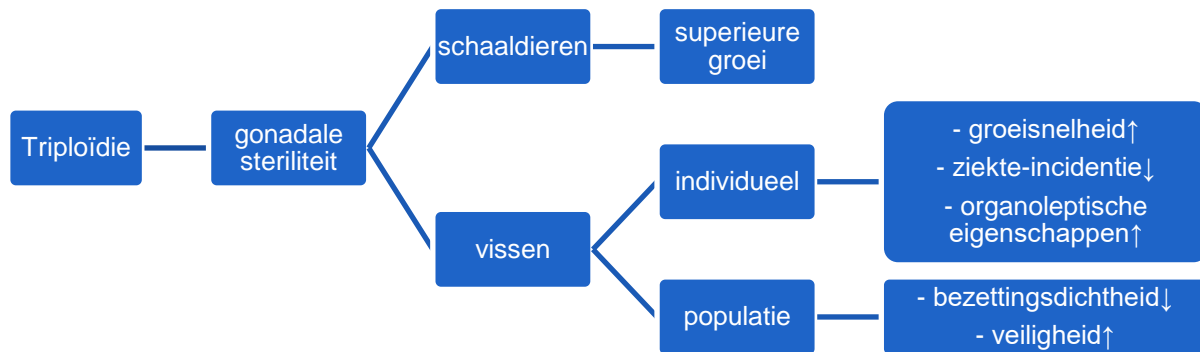
---

<sup>1</sup>FAO. 2018. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

#### 4.3.2. Aquacultuur en polyploidie: Een goede combinatie

In aquacultuur wordt gebruik gemaakt van zowel natuurlijke als artificiële polyploïden. Veel van de economisch belangrijke vissen voor aquacultuur zijn natuurlijke polyploïden of zijn geëvolueerd vanuit polyploïde voorouders. Voorbeelden hiervan zijn steuren, zalmen, gewone karpers, gibel karpers en verschillende crustacea en mollusca zoals rode moeras rivierkreeften, Japanse rivierkreeften, ridgeback kreeften, Japanse kreeften en wulken (Zhou en Gui, 2017). Er zijn ook een deel artificieel geïnduceerde polyploïden van belang, onder andere regenboogforel, bruine forel, bronforel, atlantische zalm, chinookzalm, trekzalm, amagozalm, masuzalm, cohozalm, ayu, hirame, graskarper, Japanse oester enzovoort (Zhou en Gui, 2017).

Aquacultuur maakt voornamelijk gebruik van triploïdie, de reden hiervoor is dat triploïdie een heel aantal gevolgen met zich meebrengt die gewenst zijn bij productie voor consumptie. Triploïdie verstoort de normale paring van homologe chromosomen tijdens de meiose, wat een essentieel onderdeel is in de vroege gametogenese, deze verstoring resulteert in gonadale steriliteit (Wong en Zohar, 2015). Het is deze steriliteit die aan de basis ligt voor de voordelige effecten die triploïdie gewenst maken. Het grote voordeel van triploïde schaaldieren is dat ze meer groeien dan de diploïden en dus als adult groter zullen zijn. Daarnaast heeft de Japanse oester nog een extra voordeel, namelijk dat ze door de triploïdie het hele jaar door geoogst kan worden aan dezelfde kwaliteit. Bij diploïde Japanse oesters zal tijdens het voortplantingsseizoen energie nodig zijn voor de gametogenese, waardoor de kwaliteit van de oester achteruitgaat en ze minder geschikt is voor oogst op dat moment (Nell, 2002).



Figuur 4: Overzicht van de voordelen van triploïdie bij vissen en schaaldieren die triploïdie interessant maken als toepassing in de aquacultuur.

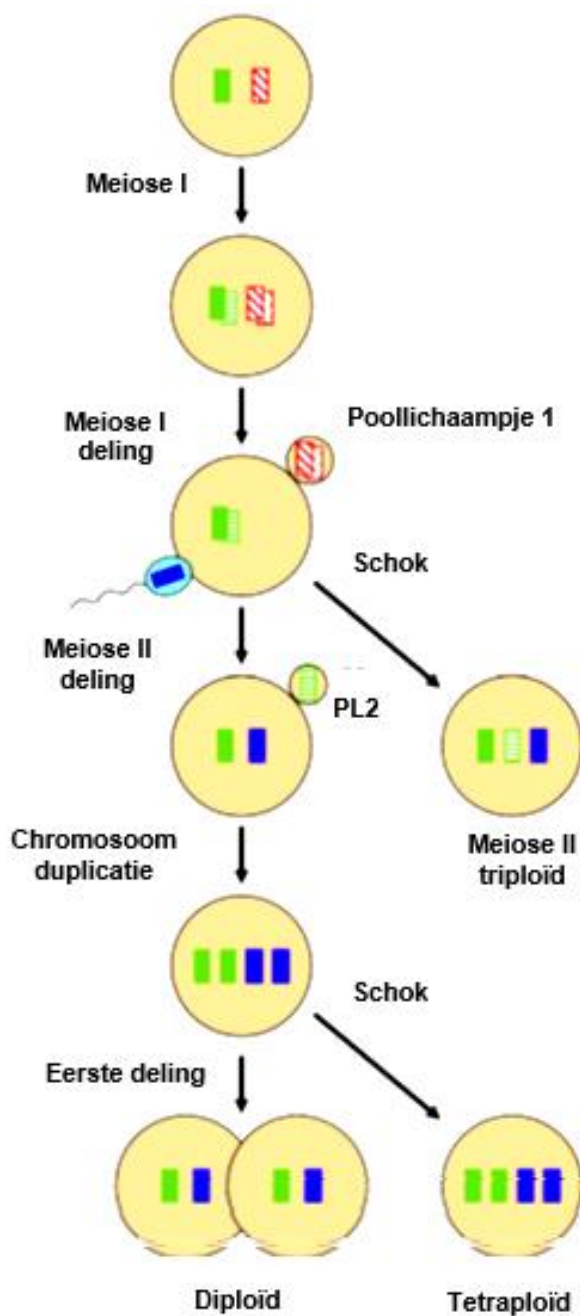
Triploïdie bij vissen is in de aquacultuur voordelig zowel op individueel niveau als op groepsniveau (figuur 4). Op individueel niveau zijn er 3 gewenste kenmerken: verhoogde groeisnelheid, verlaagde ziekte-incidentie en betere organoleptische eigenschappen (Piferrer et al., 2009 en Piferrer, 2001). Seksuele maturatie gaat bij de meeste vissen gepaard met een significante reductie in somatische groei omdat energiebronnen gebruikt worden voor de ontwikkeling van gonaden, secundaire seksuele eigenschappen en reproductief gedrag (Sheehan et al., 1999). Door de steriliteit van triploïden kan de energie wel in de somatische groei geïnvesteerd worden, waardoor triploïden een hogere groeisnelheid hebben dan hun diploïde soortgenoten. Dit betekent niet dat triploïde vissen een hoger eindgewicht bereiken, maar wel dat ze hun eindgewicht sneller bereiken. Tijdens gonadale maturatie in het voortplantingsseizoen zal het karkasgewicht lager zijn omdat de energie dan hiervoor aangewend wordt (Piferrer, 2001). Gezien de steriliteit bij triploïdie moet daar niet langer rekening mee gehouden worden, waardoor het hele jaar door de opbrengst hetzelfde zal zijn. Seksuele maturatie zorgt ook voor een verhoogde gevoeligheid voor stress en ziekte (Wong en Zohar, 2015), bij afwezigheid zal de ziekte-incidentie dus ook verlaagd zijn. Tenslotte zal ook de organoleptische kwaliteit beter zijn omdat er geen energie verbruikt moet worden voor gametogenese, waardoor meer lipiden aanwezig blijven in het visvlees, wat de smaak ten goede komt (Piferrer et al., 2009). Op groepsniveau is triploïdie niet alleen een goede manier om de bezettingsdichtheid van gekweekte en daarna uitgezette vis te controleren, maar het is ook een effectieve aanpak om de natuurlijke visgenetica te beschermen (Song et al., 2012). De steriliteit van triploïdie beschermt de wilde populaties tegen (genetische) contaminatie met gekweekte voorraden en ook tegen de introductie van niet-natieve species in lokale ecosystemen (Le Comber en Smith, 2004).

#### 4.4. Productie van triploïde vissen

##### 4.4.1. Algemene principes

Er zijn 2 hoofdpathways om triploïde vissen te produceren, namelijk directe inductie en indirecte productie door een tetraploïd met een diploïd te kruisen (Song et al., 2012), beide manieren worden visueel voorgesteld in figuur 5. Viseitjes die worden vrijgesteld in het water bevinden zich in de metafase van de tweede meiotische deling, de meiose II zal pas verdergezet worden bij het binnendringen van een spermatozoön. Bij directe artificiële inductie wordt een schok toegediend als de meiose II terug gestart is, hierdoor zal de celdeling onderdrukt worden en de extrusie van het 2<sup>e</sup> poollichaam voorkomen worden, de chromosomale deling zal echter wel doorgaan (Piferrer et al, 2009). Een schok zal op deze manier zorgen voor het ontstaan van triploïdie. Omdat bij deze triploïden twee van de drie sets van homologe chromosomen van maternale origine zijn, worden deze ook wel maternale triploïden genoemd. Bij de indirecte productie worden normale, haploïde eitjes bevrucht met diploïd sperma van een tetraploïd mannetje, de ontstane zygote zal hierdoor triploïd zijn, hier kan dan gesproken worden van paternale triploïden. De tetraploïde mannetjes kunnen geproduceerd worden door de eerste celdeling van de zygote te inhiberen wanneer de chromosomen gedupliceerd zijn net na bevruchting (Piferrer et al, 2009), ook dit gebeurt door middel van een schok.

Naast de inductie van triploïdie is ook endocriene feminisatie noodzakelijk. Bij vrouwelijke vissen zorgt de start van de meiose voor de overgang van oögonia naar oöcyt. Door de inductie van triploïdie gaat dit proces niet verder, daardoor zullen de ovaria kleiner en lichter blijven. Bij mannelijke vissen start de meiose bij de start van de puberteit, spermatogonia zullen dan reeds verschillende mitotische delingen ondergaan hebben. De testes zullen bij triploïde mannelijke vissen nog een normale grootte bereiken en ook een aanzienlijke populatie volledig functionele steroidogene cellen bezitten. Door de steroidogene cellen zullen ook de hormonale veranderingen aanwezig blijven en dus ook de negatieve effecten van seksuele maturatie. Deze endocriene feminisatie kan bereikt worden door de hormonale feminisatie van triploïden of door de triploïdisatie van volledig vrouwelijke visbestanden (Piferrer et al., 2009).



Figuur 5: Door het binnendringen van het spermatozoön wordt de meiose II voortgezet van de oöcyt. De toediening van een schok voorkomt de extrusie van het tweede poollichaampje waardoor triploidie ontstaat. De productie van tetraploïde mannetjes gebeurt door de eerste celdeling van de zygote te inhiberen. Naar Piferrer et al., 2009.

#### 4.4.2. Voor- en nadelen

De meeste voordelen van triploïdie in de aquacultuur werden reeds eerder besproken (zie 4.3.2. Aquacultuur en polyploïdie: Een goede combinatie). Er kan echter nog een extra voordeel aangehaald worden, namelijk dat gekweekte triploïden niet aanzien worden als genetisch gemodificeerde organismen. In Richtlijn 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad van 12 maart 2001 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van Richtlijn 90/220/EEG van de Raad wordt uitdrukkelijk vermeld dat polyploïdie-inductie niet als genetische modificatie beschouwd wordt. De reden die hiertoe gegeven wordt, is dat hierbij geen recombinantnucleïnezuurmoleculen of genetisch gemodificeerde organismen worden gebruikt die zijn gemaakt met behulp van anderen technieken of methoden dan mutagenese en celfusie. Polyploïdie inductie wordt dus niet aanzien als de productie van GMO's, waardoor ze dan ook vrijgesteld zijn van de strenge wetgeving hieromtrent.



Er zijn ook een heel aantal uitdagingen verbonden aan de productie van triploïden. Om een hoog percentage aan triploïden te produceren moet er rekening gehouden worden met een heel aantal factoren, de belangrijkste zijn de timing, intensiteit en duur van de schok. De timing is sterk gerelateerd aan de watertemperatuur en daarnaast speelt ook de eikwaliteit een belangrijke rol. Al deze factoren zijn ook nog eens speciesspecifiek (Piferrer et al., 2009). Bij het ontwikkelen van een methode voor triploïdie inductie moet dus met al deze onderdelen rekening gehouden worden. Inductie van dergelijke genomische veranderingen gaat ook vaak gepaard met een aanzienlijke hoeveelheid mozaïcisme (Pandian en Koteeswaran, 1998), waarbij de ploïdiegraad varieert in de weefsels. Dit is een belangrijk gegeven, aangezien steriliteit niet verzekerd kan worden als het mozaïcisme de gameten beïnvloed (Piferrer et al., 2009). Een laatste kwestie is publieke aanvaarding. Wettelijk gezien behoren polyploïden niet tot de groep van GMO's, maar dat wil niet zeggen dat de publieke opinie dezelfde is. Ook dit is een uitdaging in het heden en naar de toekomst toe.

#### 4.5. Methoden om triploïdie te induceren bij vissen

Er zijn zeer veel verschillende methoden die gebruikt kunnen worden om de ploïdiegraad te beïnvloeden (Pandian en Koteeswaran, 1998), deze zijn fysisch of chemisch (Song et al., 2012). Voordien werd reeds aangehaald dat er nood is aan een schok in de productie van triploïde vissen. Deze schok kan fysisch of chemisch zijn (Piferrer et al., 2009). Het gebruik van de chemische schok is gelimiteerd wegens de chemische toxiciteit van veel van de producten (Zhou en Gui, 2017). De fysische schok wordt het meest gebruikt, hierbij gaat het om een schok van hydrostatische druk of temperatuur (hitte of koude) (Le Comber en Smith, 2004; Piferrer et al., 2009; Song et al., 2012; Zhou en Gui, 2017).

##### 4.5.1. Fysische methoden

Bij het toedienen van een fysische schok moet rekening gehouden worden met een aantal belangrijke factoren om deze schok zo effectief mogelijk te maken. De timing van de schok is de belangrijkste factor (Piferrer et al., 2009), ook de duur en intensiteit zijn essentieel en daarnaast kan er ook nog van een familie effect gesproken worden (Benfey, 2016). De schok moet starten in de juiste ontwikkelingsfase. Bij vissen is de embryonale ontwikkelingssnelheid gerelateerd aan de watertemperatuur (Piferrer et al., 2009). De tijd na fertilisatie voor toediening van de schok moet hierdoor gestandaardiseerd worden als een functie van de temperatuur, waarbij dan bijvoorbeeld het product van de temperatuur en de tijd wordt gebruikt, uitgedrukt in °C-minuten (Benfey, 2016). De duur en intensiteit zijn belangrijk en hangen samen, er is geen universele correcte manier. Algemeen kan gesteld worden hoe hoger de intensiteit, hoe korter de benodigde duur en omgekeerd (Benfey, 2016). Tenslotte is er ook een familie-effect. In sommige families is het overlevingspercentage na de schok kleiner, of is het percentage gevormde triploïden kleiner (Devlin et al., 2010).

##### Hydrostatische druk

Bij een drukschok wordt gebruik gemaakt van een voorbijgaande, abrupte verhoging van hydrostatische druk op de bevruchte eicellen (Piferrer et al., 2009). Het onderliggende mechanisme is nog onduidelijk, maar vermoedelijk zal de druk uitgeoefend op het oolemma de extrusie van het secundaire poollichaampje tegenhouden, of is er een effect op de meiotische spoelfiguur, of een combinatie van beide (Piferrer et al., 2009). Een drukverhoging zorgt er namelijk voor dat de celmembraanfluiditeit verminderd en zorgt ook voor een desorganisatie van de microtubuli (Maxime, 2008). Het gebruik van hydrostatische druk heeft 2 duidelijke voordelen ten opzichte van een temperatuurschok. Ten eerste is een gelijke hydrostatische druk uitoefenen op alle bevruchte eicellen in een gesloten drukvat eenvoudiger dan een uniforme temperatuurbehandeling op commerciële schaal. Ten tweede is de drukbehandeling volledig onafhankelijk van de watertemperatuur, terwijl bij temperatuurschok steeds rekening gehouden moet worden met de watertemperatuur voor de schok (Benfey, 2016).

Voor sommige commercieel belangrijke species zijn reeds betrouwbare protocollen aanwezig (Preston et al., 2013), in tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de gebruikte parameters waarbij het percentage triploïdie het hoogst is, hierbij werd ook steeds een zo hoog mogelijke overleving van de zygote in rekening gebracht.

Tabel 2: Een overzicht van de parameters voor de inductie van triploidie met behulp van een hydrostatische druk schok, het percentage triploidie dat hiermee bereikt wordt en de overleving in vergelijking met een diploïde controlegroep.

Species	Hydrostatische druk	Duur	Tijd post-fertilisatie	% triploidie	% overleving	Referentie
koudwaterspecies algemeen	58-85 MPa	2-6 min	15-20 min			Piferrer et al., 2009
Atlantische zalm	65,5 MPa	5 min	300°C-min	> 98%	?	Benfey, 2016
Cohozalm	68,9 MPa	5 min	250°C-min	99,82%	> 93%	Devlin et al., 2010
Chinookzalm	68,9 MPa	5 min	300°C-min	94%	69%	Johnson et al., 2004
Trekzalm	65,5 MPa	5 min	210°C-min	100%	70%	Chiasson et al., 2009
Regenboogforel	48,2 MPa	4 min	376°C-min	100%	>80%	Chourrout, 1984
Bruine forel	68,9 MPa	5 min	300°C-min	100%	92,1%	Preston et al., 2013
Bronforel	65,5 MPa	5 min	200°C-min	?	?	Schafhauser-Smith en Benfey, 2001
warmwaterspecies algemeen	58-85 MPa	2-6 min	2-7 min			Piferrer et al., 2009
Graskarper	48,2 MPa of 55,1 MPa	1 min of 2 min	4 min bij 22-24,8°C	> 98%	69,1%	Cassani en Caton, 1986

### Temperatuur

Een temperatuurschok kan de extrusie van het tweede poollichaampje voorkomen door de ontwikkelingssnelheid te veranderen of de microtubuli van de meiotische spoelfiguur te verstoren (Piferrer et al., 2009). De ontwikkelingssnelheid verandert bij hiteschok omdat de intracellulaire de novo synthese en polymerisatie van zowel RNA als DNA moleculen verminderen (Hildebrandt et al., 2002) en bij koudeschok omdat er een vermindering is van de transcriptie en translatie (Al-fageeh en Smales, 2006). Zowel hitte als koude zorgen voor veranderingen in het cytoskelet waardoor de meiotische spoelfiguur niet gevormd kan worden (Al-fageeh en Smales, 2006; Hildebrandt et al., 2002).

Algemeen kan gesteld worden dat hiteschok meer gebruikt wordt om triploidie te induceren bij koudwatersoorten en koudeschok meer bij warmwatersoorten (Donaldson et al., 2008). Bij het gebruik van temperatuurschokken moeten 2 belangrijke opmerkingen gemaakt worden. Ten eerste is de schoktemperatuur afhankelijk van de incubatietemperatuur voor de schok, bij drukbehandeling is deze niet van belang (Benfey, 2016 en Felip et al., 2001). Ten tweede vertonen vissoorten met grote eieren een grotere intrinsieke variatie bij triploïdisatie behandeling met behulp van temperatuurschokken (Piferrer et al., 2009). In tabel 3 en 4 worden respectievelijk een overzicht gegeven van de gebruikte parameters voor hitte- en koudeschok waarbij het percentage triploidie het hoogst is, hierbij werd ook steeds een zo hoog mogelijke overleving van de zygote in rekening gebracht.

Tabel 3: Een overzicht van de parameters voor de inductie van triploïdie met behulp van een hiteschok, het percentage triploïdie dat hiermee bereikt wordt en de overleving in vergelijking met een diploïde controlegroep.

Species	Temperatuur	Duur	Tijd post-fertilisatie	% triploïdie	% overleving	Referentie
koudwaterspecies algemeen	24-32°C	10-25 min	15-20 min			Piferrer et al., 2009
Atlantische zalm	30°C	10 min	20 min bij 10°C	92%	63%	Johnstone, 1985
Coho zalm	26°C	20 min	20 min bij 10°C	95%	86,5%	Teskeredzic et al., 1993
Chinookzalm	29 °C	10 min	25 min bij 7,7°C	94%	59%	Johnson et al., 2004
Regenboogforel	26°C	20 min	25 min bij 10°C	100%	gelijkaardig aan controle	Chourrout en Quillet, 1982
Bruine forel	29°C	10 min	5 min bij 7°C	88,2%	57%	Arai en Wilkins, 1987
Bronforel	28°C	10 min	10-16 min bij 11-12°C	79-99%	68-71%	Galbreath en Samples, 2000
warmwaterspecies algemeen	34-41°C	45s – 3,5min	2-7 min			Piferrer et al., 2009
Graskarper	42°C	1 min	4 min	66,7%	72,5%	Cassani en Caton, 1986
Europese karper	40-41°C	2min of 1,5min	6 min bij 20°C	80-100%	50-70%	Recoubratsky et al., 1992

Tabel 4: Een overzicht van de parameters voor de inductie van triploïdie met behulp van een koudeschok, het percentage triploïdie dat hiermee bereikt wordt en de overleving in vergelijking met een diploïde controlegroep.

Species	Temperatuur	Duur	Tijd post-fertilisatie	% triploïdie	% overleving	Referentie
koudwaterspecies algemeen		35min – 3h	15-20 min			Piferrer et al., 2009
Atlantische zalm	niet succesvol					Lincoln et al., 1974
Heilbot	-1,1 °C	2-3h	?	92-95%	?	Holmefjord en Refstie, 1997
Atlantische kabeljauw	niet succesvol					Peruzzi et al., 2007
warmwaterspecies algemeen	-1 – 4°C	2-20min (meestal)	2-7 min			Piferrer et al., 2009
Tarbot	0°C	20 min	6-7 min bij 13-14°C	> 90%	80%	Piferrer et al., 2003
Graskarper	5°C	25-27-30 min	4 min bij 23°C	33-100%	1-16%	Cassani en Caton, 1986
Europese zeebaars	1°C	15 min	5 min bij 13°C	100%	56-76%	Peruzzi en Chatain, 2000
Rode tilapia	9°C	30 min	4 min bij 26-27°C	98,7%	63,2%	Pradeep et al., 2014
Nijl tilapia	13°C	45 min	5 min bij 30-31°C	85-100%	?	Gamal et al., 1999

#### 4.5.2. Chemische methoden

Verschillende chemische stoffen zoals cytochalasine B, colchicine, cafeïne, 6-dimethylaminopurine en polyethyleenglycol worden gebruikt om de extrusie van het poollichaampje te voorkomen (Zhou en Gui, 2017). Verder volgt hier een overzicht van deze stoffen, hun werkingsmechanisme en hun toepassingen.

Cytochalasine B is een celpermeabel mycotoxine dat geproduceerd wordt door *Helminthosporium dematioideum*. Dit mycotoxine inhibeert de cytoplasmatische deling door de vorming van contractiele microfilamenten te blokkeren<sup>2</sup>. Er zijn veel verschillende toepassingen waarvoor cytochalasine B gebruikt kan worden. In de humane geneeskunde wordt onderzoek uitgevoerd over het gebruik als chemotherapeuticum (Trendowski, 2014). Verder kan cytochalasine ook gebruikt worden voor inductie van polyploidie bij schaaldieren, zoals de gewone mossel (Beaumont et al., 1995) en de Amerikaanse oester (Stanley et al., 1981). Bij vissen is er ook onderzoek gebeurd naar de toepassingsmogelijkheden in verband met triploidie (Refstie et al., 1977 en Allen en Stanley, 1979). Hierbij werd echter steeds mozaïcisme bekomen in de cellen in plaats van een uniforme ploïdie, bijgevolg is cytochalasine B geen betrouwbare productiemethode voor triploidie bij vissen.

Colchicine is een alkaloïde afkomstig uit weidesaffraan (*Colchicum autumnale* L.). Colchicine bindt aan  $\alpha$ - en  $\beta$ -tubuline dimeren, hierdoor wordt de polymerisatie van microtubuli tijdens de celcyclus geïnhibeerd en kan de migratie van de chromosomen/chromatiden tijdens de anafase niet doorgaan. Op deze manier worden cellen gevormd met een dubbel chromosomenaantal (Sattler et al., 2016). Colchicine is bij planten het meest gebruikt antimitoticum voor de inductie van polyploidie (Sattler et al., 2016). Een voorbeeld hiervan is de productie van triploidie zaadloze watermeloenen. Via colchicinebehandeling van zaden en zaailingen worden tetraploïde watermeloenen gekweekt, dewelke gekruist worden met diploïde watermeloenen. De nakomelingen van deze kruising zijn triploïd wat gepaard gaat met enkele voordelen, zoals zaadloosheid, hogere suikerinhoud, hogere stressresistentie, hogere opbrengst en groter fruit (Song et al., 2012). Ook in de aquacultuur is er onderzocht of colchicine bruikbaar is voor polyploidie inductie. Hier is echter maar 1 artikel over verschenen bij de bronforel (Smith en Lemoine, 1979), waarbij net zoals cytochalasine B mozaïcisme werd bekomen en geen zuivere ploïdie (Felip et al., 2001). Colchicine kent wel andere waardevolle toepassingen in de geneeskunde en diergeneeskunde. In de humane geneeskunde is colchicine een onderdeel van jichtbehandeling (Belgisch Centrum voor Farmacotherapeutische informatie, 2016). In de diergeneeskunde zijn er toepassingen voor de behandeling van familiale Shar Pei fever, amyloidosis en leverfibrose (Papich, 2016).

Cafeïne is een methylxanthine alkaloïde die wordt aangetroffen in zaden, noten of bladeren van een aantal planten afkomstig uit Zuid-Amerika en Oost-Azië. Het is structureel verwant aan adenosine en zal voornamelijk werken als adenosine-receptorantagonist, waardoor het een psychotrope en ontstekingsremmende activiteit heeft<sup>3</sup>. Cafeïne wordt naar voren geschoven als een veilige, goedkope en eenvoudige methode voor triploidie inductie (Turan en Guragac, 2014). In tabel 5 worden enkele studies op een rij gezet waarin cafeïne gebruikt werd om triploidie te induceren. Bij de regenboogforel (Turan et al., 2012) en de meerval (Turan en Guragac, 2014) worden overlevingspercentages bekomen die zeer gelijkaardig zijn met de controlegroepen. Bij *Haliotis discus hannai*, een slakkensoort, werd wel een duidelijk gereduceerde overleving gevonden in vergelijking met een controlegroep (Okumura et al. 2007).

---

<sup>2</sup>National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Cytochalasin B, CID=5311281, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cytochalasin-B> (Laatst geraadpleegd op 16/03/2020)

<sup>3</sup>National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Caffeine, CID=2519, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine> (Laatst geraadpleegd op 16/03/2020)

Tabel 5: Een overzicht van enkele studies waarbij cafeïne gebruikt werd voor de inductie van triploïdie.

Species	Cafeïne	Duur	Tijd post-fertilisatie	% triploïdie	Referentie
<i>Haliotis discus hannai</i>	10mM en 15mM	24min	12min bij 20°C	91-100%	Okumura et al., 2007
Regenboogforel	15mM	10min	15min bij 10°C	45,5%	Turan et al., 2012
Afrikaanse Meerval	15mM	20min	3min bij 25°C	69,1%	Turan en Guragac, 2014
Japane oester	niet effectief				Zhang et al., 1998

6-dimethylaminopurine (6-DMAP) werkt als mediator in de destructie van microtubuli (Peachey en Allen, 2016) waardoor er geen poollichaam gevormd kan worden (Néant en Guerrier, 1988) en zo polyploidie ontstaat. Deze werking is reversibel, als 6-DMAP gereinigd wordt van het systeem, dan zullen de cellen opnieuw kunnen ontwikkelen (Peachey en Allen, 2016). 6-DMAP wordt gebruikt in experimenten met klonen. Hierbij wordt het ingezet voor verbetering van de in vitro maturatie en ontwikkeling van oöcyten en gekloonde embryo's (Kato et al., 2004). Bij tweekleppige mollusken is 6-DMAP een eenvoudige, veilige en goedkope methode om triploïdie te induceren (Desrosiers et al., 1993). Ook bij schaaldieren zoals de Japanse tijgergarnaal (Sellars et al., 2006) is de efficiëntie reeds bewezen. Bij vissen is er geen onderzoek gebeurd wat betreft het gebruik van 6-DMAP.

Polyethyleenglycol (PEG) gaat op een heel andere manier tewerk dan de voorgaande stoffen. Door incubatie van oöcyten samen met spermatozoa in polyethyleenglycol wordt dispermie bewerkstelligd (Pandian en Kirankumar, 2003). Hierbij wordt het mogelijk gemaakt voor 2 spermacellen om een eicel binnen te dringen (David en Pandian, 2006), zo zal triploïdie ontstaan. Hier kan dan gesproken worden van paternale triploïden omdat 2/3 van het genetisch materiaal afkomstig is van de spermacellen. Onderzoek (David en Pandian, 2006) heeft echter uitgewezen dat dit een methode is met een erg lage overleving, waardoor de toepassing ervan in de aquacultuur niet efficiënt zou zijn. Verder kent PEG wel een heel spectrum aan andere toepassingen, waaronder het gebruik als voedseladditief en solvens<sup>4</sup>.

#### 4.5.3. Vergelijking tussen de methoden

Het gebruik van een fysische schok heeft de voorkeur ten opzichte van een chemische schok, hiervoor zijn een aantal redenen. Enerzijds zijn de chemische methoden over het algemeen minder efficiënt dan de fysische methoden. Cytochalasine B (Allen en Stanley, 1979) en colchicine (Smith en Lemoine, 1979) kampen met het probleem van mozaïcisme. Cafeïnebehandeling heeft geen nadelig effect op het overlevingspercentage, maar het bereikte percentage triploïdie volstaat nog niet om toepasbaar te zijn in de aquacultuur (Turan en Guragac, 2014). Het gebruik van PEG heeft dan weer een zeer laag overlevingspercentage (David en Pandian, 2006), waardoor ook dit geen interessante manier is. Anderzijds moet bij het gebruik van chemische producten ook aandacht besteed worden aan hun veiligheid. Als de GHS-classificatie<sup>5</sup> van de verschillende stoffen nagegaan wordt, is het duidelijk dat er sterk moet opgelet worden bij het gebruik van deze stoffen. Cytochalasine B is bijvoorbeeld fataal bij inhalatie, inslikken en huidcontact, ook colchicine is fataal bij inslikken en kan daarnaast ook genetische defecten veroorzaken en 6-DMAP kan leiden tot irritatie van huid, ogen en ademhalingswegen. 6-DMAP (Desrosiers et al., 1993) en cafeïne (Turan et al., 2012) worden wel naar voren geschoven als veilige, goedkope en eenvoudige producten om te gebruiken. Bij cafeïne is men er nog niet in geslaagd een succesvol hoog percentage triploïdie te bereiken, maar dit leent zich wel tot verder onderzoek. Gezien het succesvol gebruik van 6-DMAP voor de inductie van triploïdie bij sommige schaaldieren (Sellars et al., 2006), is ook deze piste interessant om verder te onderzoeken bij vissen.

<sup>4</sup>National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 1,2-Ethanediol, CID=174, [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1\\_2-Ethanediol](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2-Ethanediol) (Laatst geraadpleegd op 19/03/2020)

<sup>5</sup><https://echa.europa.eu/information-on-chemicals> (laatst geraadpleegd op 18/04/2020)

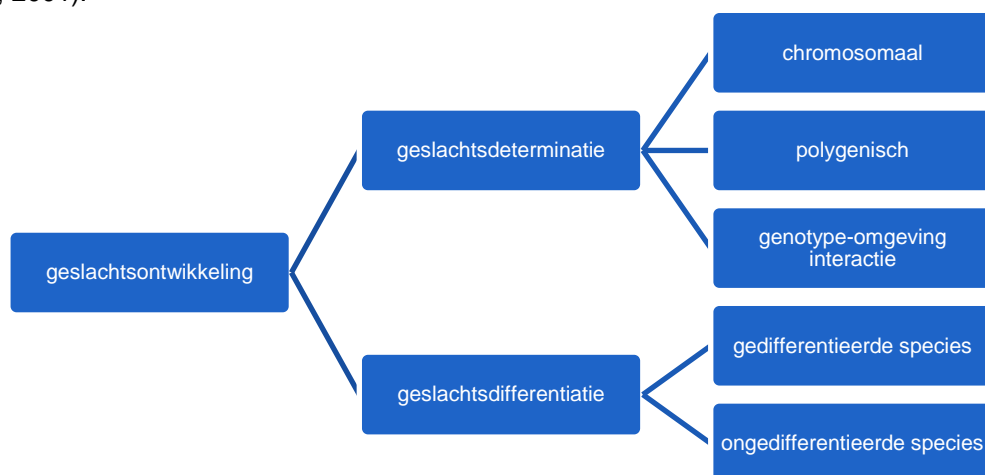
Bij de fysische schok moet er een onderscheid gemaakt worden tussen een schok van hydrostatische druk of van temperatuur. Zoals eerder aangehaald moet bij temperatuurschok rekening gehouden worden met de watertemperatuur voor de schok, omdat het verschil tussen de watertemperatuur en de schoktemperatuur de intensiteit van de schok mee bepaald (Felip et al., 2001). Daarnaast is het op commerciële schaal ook moeilijker om een uniforme schoktemperatuur toe te dienen dan een uniforme drukschok (Benfey, 2016), zeker bij soorten met grotere eicellen is dit moeilijker (Piferrer et al., 2009). Praktisch is de drukschok in deze omstandigheden dus vaak eenvoudiger, maar daartegenover staat wel dat de apparatuur vereist voor de drukschok kostelijk is (Maxime, 2008). Als de percentages triploïdie en overleving met elkaar vergeleken worden, zijn deze over het algemeen wel beter bij de drukschok. Voor Atlantische zalm (Benfey, 2016), cohozalm (Devlin et al., 2010), graskarper (Cassani en Caton, 1986) en regenboogforel (Piferrer et al., 2009) zijn de parameters voor de hydrostatische drukschok al het beste gestandaardiseerd, waarbij een percentage van meer dan 99,8% bereikt wordt, ook in minder optimale omstandigheden zou hierbij nog steeds een percentage van meer dan 98% bereikt moeten kunnen worden (Benfey, 2016).

#### 4.5.4. Endocriene feminisatie

Door de aanwezigheid van steroidogene cellen zal de steriliteit geïnduceerd door triploïdie toch niet het verwachte effect bereiken bij mannelijke vissen. De inductie van triploïdie is dus vooral interessant bij vrouwelijke vissen, de oplossing hiervoor is het gebruik van volledig vrouwelijke visbestanden. Er zijn verschillende manieren om een volledig vrouwelijk nageslacht te bekomen, elk met zijn voor- en nadelen. Om het werkingsmechanisme achter deze methoden te begrijpen is het noodzakelijk om een basisinzicht te hebben over hoe geslachtsdeterminatie en -differentiatie in zijn werk gaat bij vissen.

#### Geslachtsdeterminatie en -differentiatie

De uiteindelijke geslachtsontwikkeling wordt bepaald door 2 processen, namelijk geslachtsdeterminatie en geslachtsdifferentiatie (figuur 6). Geslachtsdeterminatie resulteert in het genetische geslacht (genotype), geslachtsdifferentiatie daarentegen voor de ontwikkeling van het gonadale geslacht, testis of ovaria (fenotype) (Piferrer, 2001). Bij vissen worden 3 modellen van geslachtsdeterminatie beschreven: (1) chromosomale overerving waarbij geslachtschromosomen de meerderheid van de geslachtsbepalende genen bevatten, het meest eenvoudige systeem met XX/XY of WZ/ZZ is hierbij het meest voorkomende bij vissen, (2) polygenische overerving waarbij zowel geslachtschromosomen (heterosomen) als andere chromosomen (autosomen) van belang zijn en (3) omgevings-geslachtsbepaling waarbij genotype-omgeving interacties een rol spelen. Voor de differentiatie wordt een onderscheid gemaakt tussen gedifferentieerde en ongedifferentieerde species. Bij gedifferentieerde species zal er een directe ontwikkeling zijn van de primaire gonade naar ovaria of testis. Bij ongedifferentieerde species is er eerst een ontwikkeling van een ovariumachtige gonade waarbij nadien de helft doorgroeit naar een ovarium en de andere helft testiculaire differentiatie ondergaat. Geslachtshormonen zijn betrokken bij de geslachtsdifferentiatie, door exogene geslachtshormonen toe te dienen aan ongedifferentieerde species is het mogelijk om het proces van differentiatie te beïnvloeden (Piferrer, 2001).



Figuur 6: Een overzicht van geslachtsontwikkeling.

## Feminisatie

Er zijn 2 methoden voor de feminisatie van vissen, namelijk hormoontherapie en de inductie van gynogenese (Piferrer, 2001). De hormoontherapie maakt gebruik van geslachtshormonen en kan nog verder opgedeeld worden in een directe en een indirecte techniek. De directe techniek zal met behulp van oestrogenenbehandeling tijdens de vroege ontwikkeling feminisatie bereiken. De indirecte techniek gebruikt manipulatie van endocrium, genetica of omgeving van voorgaande generaties om monosex gameten te produceren (Donaldson, 1996). Gynogenese is een speciaal type van parthenogenese waarbij de geproduceerde nakomelingen alleen uit het maternale genotype bestaan en daardoor dus steeds vrouwelijk zijn. Dit proces omvat 2 stappen, de eerste stap is de productie van gynogenetische haploïden door eicellen te activeren met behulp van genetisch geïnactiveerde spermatozoa, de tweede stap is de diploïdie herstellen door de tweede meiotische deling van het ei (meiotische gynogenese) te onderdrukken of door de eerste mitotische deling van de zygote (mitotische gynogenese) te voorkomen, dit wordt bereikt door de toediening van een schok (Chen et al., 2017).

Tabel 6: Een overzicht van de methoden die gebruikt kunnen worden voor feminisatie van vissen (Piferrer, 2001).

Directe feminisatie	Indirecte feminisatie	Gynogenese
onafhankelijk van de manier van geslachtsdeterminatie en onafhankelijk van welk van de geslachten homogametisch is	species waarbij vrouwelijke vissen het homogametische geslacht zijn (XX)	species waarbij vrouwelijke vissen het homogametische geslacht zijn (XX)
seksueel ongedifferentieerde vis ↓ oestrogeenbehandeling ↓ volledig vrouwelijk visbestand	masculinisatie van genotypische vrouwtjes (XX) = nieuwe mannetjes ↓ sperma van nieuwe mannetjes (X) x normale eicel (X) ↓ F <sub>2</sub> : volledig vrouwelijk visbestand	geïnactiveerd sperma ↓ gynogenese ↓ haploïde nakomeling die enkel maternaal genetisch materiaal bezit ↓ herstel van diploïdie door schok (temperatuur of druk)
gewenste gonadale geslacht in de behandelde generatie	gewenste gonadale geslacht in verdere generatie	gewenste gonadale geslacht in de behandelde generatie

Van deze technieken geniet de indirecte feminisatie de meeste voorkeur. Bij directe feminisatie worden hormonen gebruikt in vissen die nadien op de markt zouden komen. De marketing van deze hormonaal behandelde vissen is niet eenvoudig, de wetgeving omtrent gezondheid en voedselveiligheid staat dit vaak niet toe wegens bezorgdheid omtrent publieke gezondheid en omgeving (Cnaani en Levavi-Sivan, 2009). Bij indirecte feminisatie worden ook hormonen gebruikt, maar niet in de generatie die uiteindelijk op de markt komt. Geïnduceerde gynogenese resulteert in een verhoogde mortaliteit te wijten aan een verhoogde homozygositeit en de behandeling tijdens de vroege embryonale ontwikkeling (Piferrer, 2001). De indirecte feminisatie is dus de meest interessante techniek om te gebruiken, maar er moet wel rekening mee gehouden worden dat dit enkel mogelijk is voor species waarbij vrouwelijke vissen het homogametische (XX) geslacht zijn, voor andere species is er dus nood aan een alternatief zoals directe feminisatie (Piferrer, 2001).

### 4.5.5. Determinatie van de graad van ploïdie

Er zijn heel wat verschillende methoden ontwikkeld om de graad van ploïdie te bepalen (Felip et al. 2001; Maxime, 2008; Piferrer et al., 2009; Tiwary et al., 2004), een overzicht hiervan wordt weergegeven in tabel 7. Elke techniek heeft zijn voor- en nadelen. De keuze van de methode is onder andere afhankelijk van het doel en de kosten. Als bijvoorbeeld de ploïdiegraad van een hele populatie geanalyseerd moet worden en geld is onbelangrijk, dan is flow cytometrie de meest aangewezen manier (Maxime, 2008).

Tabel 7: Een overzicht van de methoden voor de determinatie van de graad van ploïdie (Felip et al. 2001; Maxime, 2008; Piferrer et al., 2009; Tiwary et al., 2004).

Directe methode	Indirecte methode
<ul style="list-style-type: none"> <li>- karyotypering</li> <li>- DNA-inhoud: flow cytometrie</li> <li>- genotypering van microsatelliet DNA-merkers</li> <li>- nuclear organizing regions (NOR) analyse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- grootte van kern en cel</li> <li>- tellen van nucleoli</li> <li>- elektroforese van eiwitten</li> </ul>

De twee meest gebruikte manieren op dit moment zijn karyotypering en flow cytometrie (Liu et al., 2020). Karyotypering of chromosoomtelling is een methode met een hoge precisie, maar vraagt tegelijk ook erg veel tijd (Tiwary et al., 2004), waardoor toepassing op grote schaal moeilijk haalbaar is. Flow cytometrie is de gouden standaard voor de analyse van de genomgrootte (Fiske et al., 2019). Het is bovendien ook snel en bruikbaar voor een groot aantal cellen (Thorgaard et al., 1982). Bloedstalen worden verzameld en er wordt een fluorescente kleuring aan toegevoegd, bijvoorbeeld diamidino-2-fenylindole (Thorgaard et al., 1982; De Schepper et al., 2001) of Vindelov's propidiumiodide oplossing (Fiske et al., 2019). Hierna wordt flow cytometrie uitgevoerd waarbij de fluorescentie van de cellen wordt geanalyseerd. Het is deze graad van fluorescentie die gerelateerd is met de ploïdiegraad, gezien de kleuring een specifieke marker voor DNA bevat (Thorgaard et al., 1982). De nadelen van flow cytometrie zijn dat het een dure methode is en moeilijk bruikbaar bij erg kleine stalen van bijvoorbeeld insecten (Liu et al., 2020).

Er wordt ook onderzoek gedaan naar het gebruik van kwantitatieve PCR (qPCR) als alternatief voor flow cytometrie (Zhang et al., 2019; Liu et al., 2020). Bij qPCR wordt gebruik gemaakt van een paar oligonucleotideprimers, DNA polymerase en deoxynucleotiden. De oligonucleotideprimers binden aan een enkele streng van het dubbelstrengig DNA, hierdoor wordt een bepaald gebied overspannen. Deze primers zullen als basis dienen voor DNA-polymerase dat een complementaire DNA streng kan maken door de toevoeging van deoxynucleotiden. Het overspannen gebied zal daardoor exponentieel vermeerderd worden (Overbergh et al., 2010). Het DNA wordt gekopieerd tot het een bepaalde sterkte van signaal produceert. Het aantal amplificatiecycli die nodig zijn om dit punt te bereiken wordt dan gebruikt om te berekenen hoeveel DNA moleculen met deze sequentie origineel aanwezig waren (Baker, 2012). Flow cytometrie en qPCR zijn beide even efficiënt (Zhang et al., 2019), maar het voordeel van qPCR is dat het geschikt is voor kleinere stalen en goedkoper is (Liu et al., 2020). De stalen voor flow cytometrie zijn verse weefsels. Een klein organisme kan op deze manier maar een beperkt aantal stalen produceren. qPCR daarentegen maakt gebruik van DNA om de ploïdiegraad te bepalen, hierbij is het mogelijk om meerdere detecties uit te voeren op een enkel DNA-staal (Liu et al., 2020). Daarnaast zijn ook de vereisten van instrumenten en materiaal lager en goedkoper bij qPCR (Zhang et al., 2019).

#### 4.6. Toepassingen voor triploïdie in aquacultuur

Onderzoek naar polyploïdie inductie in aquacultuur species begon in de jaren 1970-1980 in het Verenigd Koninkrijk, de Verenigde Staten van Amerika en Canada, waarna het zich verder uitbreidde naar meerdere landen en verschillende species (Piferrer et al., 2009). Zoals eerder aangehaald (zie 3.3.1. Aquacultuur: een groeiende sector) is aquacultuur een sterk groeiende sector die erg van belang is om de druk op de natuurlijke visvoorraden door visserij te verminderen. De belangrijkste triploïde species die op dit moment gebruikt worden in de aquacultuur en visserij management zijn zalmachtigen, dan vooral regenboogforel, bruine forel en Atlantische zalm, ayu, modderkruipers en graskarpers (Fraser et al., 2012). In de Europese aquacultuur wordt triploïdie het meest toegepast in de productie van consumptievij (zalmachtigen) en schaaldieren (Japanse oester) en in het aanvullen van visvoorraden voor de sportvisserij. De Europese triploïde forelproductie in 2009 werd geschat op 15 000 ton (Piferrer et al., 2009). In Frankrijk, een van de grootste Japanse oester producenten, is 15% van het totaal aantal verkochte oesters triploïd<sup>6</sup>.

<sup>6</sup>DEBUCQUET, G., MERDJI, M., LAMBERT, J.L. ; La perception des huîtres triploïdes par les consommateurs et les acteurs de la filière ostréicole, Rapport final, juin 2003, Convention n°01CV069 INSU-CNRS / AUDENCIA, Equipe associée : IFREMER de La Tremblade



Zoals aangehaald in 4.3.2. heeft triploïdie een heel aantal voordelen voor de aquacultuur zoals een hogere groeisnelheid, betere organoleptische kwaliteit en een lagere ziekte-incidentie. Daarnaast is triploïdie ook van groot belang om de natuurlijke vispopulaties te beschermen en om de dichtheid van de gekweekte vissen te verlagen. Bij het kweken van vissoorten zoals zalm wordt vaak gebruik gemaakt van hun natuurlijke habitat voor de opfok. Als vissen kunnen ontsnappen, dan zorgt dit voor een negatieve genetische en ecologische impact op de natuurlijke populaties (Thorstad et al., 2008). Om dit risico te reduceren moet in de eerste plaats ingezet worden op goede fysieke barrières en operationeel management. De verhindering van reproductie kan daarnaast gebruikt worden als deze maatregelen toch falen. Geïnduceerde triploïdie is hierbij de enige aanpak die haalbaar is op commerciële schaal (Benfey, 2016).

Ook in de sportvisserij speelt triploïdie een belangrijke rol. Niet inheemse vissen worden vaak gebruikt om meren te bevoorraden voor sportvisserij die sociaal en economisch zeer belangrijk is voor sommige regio's zoals de Alpen (Budy et al., 2012). De introductie van vreemde vissoorten kan echter een negatief effect hebben op conservatie van bepaalde inheemse vissoorten (Ráb et al., 2007). Triploïde vissen zijn waardevol om sportvisserij te behouden in meren waar de natuurlijke reproductie niet volstaat, zonder hierbij de genetica van het natieve ecosysteem te verstoren. Tegelijk zal de steriliteit ervoor zorgen dat het risico verkleind wordt op uitbreiding van deze soorten in andere wateren waar andere vissoorten dan in de problemen zouden kunnen komen (Budy et al., 2012).

Tenslotte wordt er ook gebruik gemaakt van triploïde vissen als biologische onkruidbestrijders. Initieel werd de graskarper in de Verenigde Staten geïntroduceerd aan het einde van de jaren zestig als biologische bestrijding voor schadelijke waterplanten. Deze karpers waren echter diploïd, zijn zich gaan reproduceren en sterk gaan verspreiden in de Amerikaanse wateren. Een grote zorg is nu het ontstaan van een zelfonderhoudende karperpopulatie in de grote meren (Wittmann et al., 2014; Embke et al., 2016). Deze diploïde graskarpers werden daardoor snel vervangen door hun triploïde soortgenoten, die gezien worden als een veilige, niet-reproducerende biologische onkruidbestrijder (Allen en Wattendorf, 1987). Op zichzelf zijn triploïde karpers echter geen goede methode voor bestrijding van wateronkruid, hiervoor is een te hoge dichtheid aan vissen nodig, waardoor ze een impact zouden hebben op alle onderdelen van het ecosysteem (Dick et al., 2016). Het alternatief is het gebruik van geïntegreerde onkruidbestrijding. Overgroei van onkruid wordt hierbij snel vastgesteld en behandeld met geregistreerde herbiciden, daarna worden triploïde graskarpers in het water uitgezet om de hergroei van dit onkruid te minimaliseren (Dick et al., 2016). Op deze manier kan het gebruik van herbiciden geminimaliseerd worden en kan daarna ook een kleinere hoeveelheid vissen geïntroduceerd worden<sup>7</sup>, zo wordt aan de originele plantenpopulatie ook de kans gegeven om terug te groeien (Dick et al., 2016).

## 5. Discussie

Polyploïdie is een oud gegeven en gaat mee van in veel vroegere tijden waarin volledige genoomduplicaties mee aan de basis lagen voor het ontstaan van nieuwe soorten. Ook op heden is polyploïdie echter van groot belang. De toepassing van triploïdie in de aquacultuur heeft vele voordelen en is wijdverspreid bij de Japanse oester. Ook bij vissen wordt er reeds frequent gebruik van gemaakt op verschillende vlakken.

---

<sup>7</sup>Kirk, J. P., and K. L. Manuel. 2011. *Application of early detection and rapid response management techniques to control hydrilla*. APCRP Technical Notes Collection. ERDC TN-APCRP-BC-23. Vicksburg, MS: U.S. Army Engineer Research and Development Center.

Er zijn veel verschillende manieren onderzocht om triploïdie te induceren bij vissen. Hieruit is gebleken dat de drukschok de algemene voorkeur heeft. Een chemische schok heeft duidelijke nadelen ten opzichte van een fysische schok, maar toch kan het interessant zijn om het gebruik van cafeïne en 6-DMAP verder te onderzoeken in deze context. Bij de fysische schok wordt de drukschok aanzien als de meest eenvoudige en efficiënte manier, maar ook de duurste. In de toekomst kan het dan ook nuttig zijn om te onderzoeken hoe men de benodigdheden voor het toedienen van een drukschok goedkoper kan maken. Naast het toedienen van de schok zijn er nog 2 onderdelen van essentieel belang in het gehele productieproces, namelijk endocriene feminisatie en determinatie van de ploïdiegraad. Voor de productie van volledig vrouwelijke visbestanden geniet de indirecte feminisatie de voorkeur. Karyotypering en flow cytometrie zijn momenteel de meest gebruikte methoden om de ploïdiegraad te bepalen. Recente studies over het gebruik van qPCR tonen echter aan dat deze methode geen last heeft van de beperkingen waarmee flow cytometrie kampt. Vandaar is het zeker mogelijk dat qPCR de andere methoden in de toekomst zal vervangen.

Om de productie van triploïde soorten op grote schaal verder uit te breiden zijn er echter nog factoren waarmee rekening gehouden moet worden. Het is niet enkel de productie zelf die mogelijk moet zijn, ook de producenten en consumenten spelen een grote rol. Om producenten te overtuigen de overstap te maken van diploïde naar triploïde aquacultuur speelt het economische plaatje mee. Berrill et al. hebben onderzoek gedaan naar dit aspect van het verhaal bij de regenboogforel (Berrill et al., 2012). Hieruit blijkt dat de overstap naar de productie van triploïde regenboogforel economisch voordelig zou zijn voor de producenten. Debucquet et al.<sup>6</sup> hebben bekeken wat de opinie is van de producenten en consumenten wat betreft triploïde Japanse oesters. Hierin komen zowel positieve reacties alsook bezorgdheden naar boven. Er geen studie die de opinie toetst van visproducenten en -consumenten betreffende het gebruik van triploïdie. Het zou interessant zijn om hier verder onderzoek naar te doen. De effectieve reactie van consumenten is misschien moeilijk te voorspellen, marketing en informeren zal hierin een essentiële rol spelen. De publieke aanvaarding van triploïdie is misschien wel een van de grootste uitdagingen waar deze sector nog voorstaat.

Naar de toekomst toe kan de schaal waarop triploïdie reeds wordt toegepast nog sterk vergroot worden. Daarnaast zijn er ook nog andere toepassingen die in de toekomst interessant kunnen zijn. De combinatie van GMO's met triploïdie kan nuttig zijn omdat de geïnduceerde steriliteit de natuurlijke vispopulaties beschermt in het geval er ontsnapping is van deze GMO's naar het wild (Piferrer et al., 2009). Triploïdie kan ook helpen om bedreigde of uitgeroeide diersoorten te beschermen of genereren. Hierbij worden primordiale kiemcellen of spermatogonia van een doelsoort in een andere steriel gemaakte soort getransplanteerd. De ontvangersoort is dan bij voorkeur een soort waarvan de opfoktechnieken goed gekend zijn. De ontvangersoort zal op deze manier spermacellen en eicellen produceren van de doelsoort (Okutsu et al., 2007). Dit kan gebruikt worden om het aantal dieren van een bedreigde soort weer op te krikken. Op deze manier zouden ook soorten gekweekt kunnen worden in aquacultuur die om praktische redenen anders moeilijk te houden zijn. Een voorbeeld hiervan is de blauwvin tonijn (Piferrer et al., 2009), de broedieren zijn te groot om te houden in de aquacultuur. Door als ontvangersoort een kleinere vissoort te gebruiken zou de kweek van blauwvin tonijn beter mogelijk worden.

## 6. Conclusie

Triploïde vissen kunnen een belangrijk onderdeel van de toekomst vormen. Er is een variatie aan reeds gebruikte toepassingen die in de toekomst nog verder uitgebreid kunnen worden. Het is essentieel dat er onderzoek blijft uitgevoerd worden naar het optimaliseren van de productiemethoden. Daarnaast zal er ook hard gewerkt moeten worden aan het imago van triploïdie en hoe dit naar het publiek gebracht wordt. Tenslotte is het zeer belangrijk om een brede visie te behouden op de toepassingsmogelijkheden, deze kunnen in de toekomst zeker nog verder uitgebreid worden.

## 7. Referentielijst

- Al-fageeh, M.B., Smales, C.M., 2006. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochemical Journal* 397, 247-259.
- Allen, S.K., Stanley, J.G., 1979. Polyploid Mosaics Induced by Cytochalasin B in Landlocked Atlantic Salmon *Salmo salar*. *American Fisheries Society* 108, 462-466.
- Allen, S.K., Wattendorf, R.J., 1987. Triploid Grass Carp: Status and Management Implications. *Fisheries* 12 (4), 20-24.
- Arai, K., Wilkins, N.P., 1987. Triploidization of Brown Trout (*Salmo trutta*) by Heat Shocks. *Aquaculture* 64, 97-103.
- Avise, J.C., 2015. Evolutionary perspectives on clonal reproduction in vertebrate animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (29), 8867-8873.
- Baker, M., 2012. Digital PCR hits its stride. *Nature Methods* 9 (6), 541-544.
- Beaumont, A.R., Fairbrother, J.E., Hoare, K., 1995. Multilocus heterozygosity and size: a test of hypotheses using triploid *Mytilus edulis*. *Heredity* 75, 256-266.
- Belgisch Centrum voor Farmacotherapeutische informatie, 2016. Osteo-articulaire aandoeningen: Jicht. In: *Gecommentarieerd geneesmiddelenrepertorium 2016*, Christiaens, T., Gent, België, pp. 288-289.
- Benfey, T.J., 2016. Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. *Reviews in Aquaculture* 8, 264-282.
- Berrill, I.K., MacIntyre, C.M., Noble, C., Kankainen, M., Turnbull, J.F., 2012. Bio-economic costs and benefits of using triploid rainbow trout in aquaculture: reduced mortality. *Aquaculture Economics and Management* 16(4), 365-383.
- Budy, P., Thiede, G.P., Dean, A., Olsen, D., Rowley, G., 2012. A Comparative and Experimental Evaluation of Performance of Stocked Diploid and Triploid Brook Trout. *North American Journal of Fisheries Management* 32, 1211-1224.
- Cassani, J.R., Caton, W.E., 1986. Efficient production of triploid grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) utilizing hydrostatic pressure. *Aquaculture* 55, 43-50.
- Chen, R., Lou, B., Xu, D., Zhan, W., Takeuchi, Y., Yang, F., Liu, F., 2017. Induction of meiotic gynogenesis in yellow drum (*Nibea albiflora*, Sciaenidae) using heterologous sperm and evidence for female homogametic sex determination. *Aquaculture* 476, 667-674.
- Chen, Z.J., 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in plant science* 15 (2), 57-71.
- Chiasson, M.A., Pelletier, C.S., Benfey, T.J., 2009. Triploidy and full-sib family effects on survival and growth in juvenile Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture* 289, 244-252.
- 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, 111-126.
- Chourrout, D., Quillet, E., 1982. Induced gynogenesis in the Rainbow Trout: Sex and Survival of Progenies Production of All-Triploid Populations. *Theoretical and Applied Genetics* 63, 201-205.
- Cnaani, A., Levavi-Sivan, B., 2009. Sexual development in Fish, *Practical Applications for Aquaculture*. Sexual development 3, 164-175.
- Comai, L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* 6 (11), 836-846.

- David, C.J., Pandian, T.J., 2006. Maternal and paternal hybrid triploids of tetras. *Journal of Fish Biology* 69, 1102-1119.
- De Schepper, S., Leus, L., Mertens, M., Van Bockstaele, E., De Loose, M., 2001. Flow Cytometric Analysis of Ploidy in *Rhododendron* (subgenus *Tsutsusi*). *Hort Science* 36(1), 125-127.
- Desrosiers, R.R., Gérard, A., Peignon, J., Naciri, Y., Dufresne, L., Morasse, L., Ledu, C., Phelipot, P., Guerrier, P., Dubé, F., 1993. A novel method to produce triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 170, 29-43.
- Devlin, R.H., Sakhrani, D., Biagi, C.A., Eom, K., 2010. Occurrence of incomplete paternal chromosome retention in GH-transgenic coho salmon being assessed for reproductive containment by pressure-shock-induced triploidy. *Aquaculture* 304, 66-78.
- D'Haeninck, L., Dekeersmaeker, L., Hempen, B., Geris, K., Goossens, R., Vernemmen, P., 2009. Doorgeven van DNA tijdens de celdeling. In: *Biogenie 6.2 deel I*, First Edn. De Boeck nv, Antwerpen, België, pp. 34-62.
- Dick, G.O., Smith, D.H., Schad, A.N., Ownes, C.S., 2016. Native aquatic vegetation establishment in the presence of triploid grass carp. *Lake and Reservoir Management* 32 (3), 225-233.
- Donaldson, E.M., 1996. Manipulation of reproduction in farmed fish. *Animal Reproduction Science* 42, 381-392.
- Donaldson, M.R., Cooke, S.J., Patterson, D.A., Macdonald, J.S., 2008. Cold shock and fish. *Journal of Fish Biology* 73, 1491-1530.
- Embke, H.S., Kocovsky, P.M., Richter, C.A., Pritt, J.J., Mayer, C.M., Qian, S.S., 2016. First direct confirmation of grass carp spawning in an Great Lakes tributary. *Journal of Great Lakes Research* 42, 899-903.
- Erenpreisa, J., Salmina, K., Huna, A., Jackson, T.R., Vazquez-Martin, A., Cragg, M.S., 2014. The “virgin birth”, polyploidy, and the origin of cancer. *Oncoscience* 2 (1), 3-14.
- Evans, B.J., Upham, N.S., Golding, G.B., Ojeda, R.A., Ojeda, A.A., 2017. Evolution of the Largest Mammalian Genome. *Genome Biology and Evolution* 9 (6), 1711-1724.
- Fankhauser, G., 1945. The Effects of Changes in Chromosome Number on Amphibian Development. *The Quarterly Review of Biology* 20(1), 20-78.
- Fiske, J.A., Van Eenennaam, J.P., Todgham, A.E., Young, S.P., Holem-Bell, C.E., Goodbla, A.M., Schreier, A.D., 2019. A comparison of methods for determining ploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture* 507, 435-442.
- Flajshans, M., Kohlmann, K., Ráb, P., 2007. Autotriploid tench *Tinca tinca* (L.) larvae obtained by fertilization of eggs previously subjected to postovulatory ageing *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Fish Biology* 71 (3), 868-876.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001. Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111, 175-195.
- Fraser, W.K.T., Fjeldal, P.G., Hansen, T., Mayer, I., 2012. Welfare considerations of triploid fish. *Reviews in Fisheries Science* 20 (4), 192-211.
- Galbreath, P.F., Samples, B.L., 2000. Optimization of Thermal Shock Protocols for Induction of Triploidy in Brook Trout. *North American Journal of Aquaculture* 62, 249-259.
- Gallardo, M.H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A., Köhler, N., 1999. Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 401, 341.
- Gamal, A.A., Davis, K.B., Jenkins, J.A., Les Torrains, E., 1999. Induction of Triploidy and Tetraploidy in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Journal of the World Aquaculture Society* 30(2), 269-275.

- Gregory, T.R., Mable, B.K., 2005. Polyploidy in animals. In: The evolution of the genome, First Edn., Academic Press, Cambridge, Massachusetts, USA, pp. 427-517.
- Hegarty, M.J., Barker, G.L., Brennan, A.C., Edwards, K.J., Abbott, R.J., Hiscock, S.J., 2008. Changes to gene expression associated with hybrid speciation in plants: further insights from transcriptomic studies in *Senecio*. Philosophical Transactions of the Royal Society B 363, 3055-3069.
- Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Screenivasa, G., Kerner, T., Felix, R., Riess, H., 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. Critical Reviews in Oncology/Hematology 43, 33-56.
- Holmefjord, I., Refstie, T., 1997. Induction of triploidy in Atlantic halibut by temperature shocks. Aquaculture International 5(2), 169-173.
- Johnson, R.M., Shrimpton, J.M., Heath, J.W., Heath, D.D., 2004. Family, induction methodology and interaction effects on the performance of diploid and triploid chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture 234, 123-142.
- Johnstone, R., 1985. Induction of triploidy in atlantic salmon by heath shock. Aquaculture 49, 133-139.
- Katoh, M., Araki, A., Ogura, T., Valdivia, R.P.A., 2004. 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), which is used to produce most cloned animals, is mutagenic in *Salmonella typhimurium* TA1535. Mutation Research 560, 199-201.
- Le Comber, S.C., Smith, C., 2004. Polyploidy in fishes: patterns and processes. Biological Journal of the Linnean Society 82, 431-442.
- Lincoln, R.F., Aulstad, D., Grammeltvedt, A., 1974. Attempted triploid induction in atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. Aquaculture 4, 287-297.
- Liu, Q., Zhang, C., Zhou, J., Dong, Q., Huo, L., Dong, H., 2020. One simple, rapid and economical method for ploidy detection of *Trichogramma dendrolimi* Matsumura (Hymenoptera Trichogrammatidae). Journal of Asia-Pacific Entomology 23, 345-349.
- Mable, B.K., 2004. 'Why polyploidy is rarer in animals than in plants': myths and mechanisms. Biological Journal of the Linnean Society 82, 453-466.
- Mable, B.K., Alexandrou, M.A., Taylor, M.I., 2011. Genome duplication in amphibians and fish: an extended synthesis. Journal of Zoology 284, 151-182.
- Maxime, V., 2008. The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. Fish and Fisheries 9, 67-78.
- Neant, I., Guerrier, P., 1988. 6-Dimethylaminopurine Blocks Starfish Oocyte Maturation by Inhibiting a Relevant Protein Kinase Activity. Experimental Cell Research 176, 68-79.
- Nell, J.A., 2002. Farming triploid oysters. Aquaculture 210, 69-88.
- Oberlander, K.C., Dreyer, L.L., Goldblatt, P., Suda, J., Peter Linder, H., 2016. Species-rich and polyploid-poor: Insights into the evolutionary role of whole-genome duplication from the Cape flora biodiversity hotspot. American Journal of Botany 103 (7), 1336-1347.
- Okumura, S., Arai, K., Harigaya, Y., Eguchi, H., Sakai, M., Senbokuya, H., Furukawa, S., Yamamori, K., 2007. Highly efficient induction of triploid Pacific abalone *Haliotis discus hannai* by caffeine treatment. Fisheries Science 73, 237-243.
- Okutsu, T., Shikina, S., Kanno, M., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2007. Production of Trout Offspring from Triploid Salmon Parents. Science 317, 1517.
- Otto, S.P., 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. Cell 131 (3), 452-462.
- Otto, S.P., Whitton, J., 2000. Polyploid Incidence and Evolution. Annual Review of Genetics 2000 (34), 401-437.

- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Mathieu, C., 2010. Real-Time Polymerase Chain Reaction. In: Patrinos, G.P., Ansorge, W.J., Molecular Diagnostics, Second Edn., Academic Press Elsevier, London, Verenigd Koninkrijk, pp. 87-105.
- Pandian, T.J., Kirankumar, S., 2003. Androgenesis and conservation of fishes. *Current Science* 85(7), 917-931.
- Pandian, T.J., Koteeswaran, R., 1998. Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384, 167-243.
- Papich, M.G., 2016. Colchicine. In: Saunders Handbook of Veterinary Drugs, Fourth Edn., Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, pp.184-185.
- Peachey, B.L., Allen, S.K., 2016. Evaluation of cytochalasin B and 6-dimethylaminopurine for tetraploidy induction in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 450, 199-205.
- Peruzzi, S., Chatain, B., 2000. Pressure and cold shock induction of meiotic gynogenesis and triploidy in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* L.: relative efficiency of methods and parental variability. *Aquaculture* 189, 23-37.
- Peruzzi, S., Kettunen, A., Primicerio, R., Kauric, G., 2007. Thermal shock induction of triploidy in Atlantic cod (*Gadu smorhua* L.). *Aquaculture Research* 38, 926-932.
- Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197, 229-281.
- Piferrer, F., Cal, R.M., Gomez, C., Bouza, C., Martinez, P., 2003. Induction of triploidy in the turbot (*Scophthalmus maximus*) II. Effects of cold shock in timing and induction of triploidy in a large volume of eggs. *Aquaculture* 220, 821-831.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J., Flajshnas, M., Haffray, P., Colombo, L., 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture* 293, 125-156.
- Pradeep, P.J., Srijaya, T.C., Hassan, A., Chatterji, A.K., Withyachumnarnkul, B., Jeffs, A., 2014. Optimal conditions for cold-shock induction of triploidy in red tilapia. *Aquaculture International* 22, 1163-1174.
- Preston, A.C., Taylor, J.F., Craig, B., Bozzolla, P., Penman, D.J., Migaud, H., 2013. Optimization of triploidy induction in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture* 414-414, 160-166.
- Ráb, P., Bohlen, J., Rábová, M, Flajshans, M., Kalous, L, 2007. Cytogenetics as a tool box in fish conservation: The present situation in Europe. In: Fish Cytogenetics, First Edn. Science Publisher, Editors: Pisano, E., Ozouf-Costaz, C., Foresti, F., Kapoor, B.G., Enfield, Connecticut, USA, pp. 215-241.
- Recoubratsky, A.V., Gomelsky, B.I., Emelyanova, O.V., Pankratyeva, E.V., 1992. Triploid common carp produced by heat shock with industrial fish-farm technology. *Aquaculture* 108, 13-19.
- Refstie, T., Vassvik, V., Gjedrem, T., 1977. Induction of polyploidy in salmonids by cytochalasin B. *Aquaculture* 10, 65-74.
- Renny-Byfield, S., Wendel, J.F., 2014. Doubling down on genomes: Polyploidy and crop plants. *American Journal of Botany* 101 (10), 1711-1725.
- Sattler, M.C., Carvalho, C.R., Wellington, R.C., 2016. The polyploidy and its keyrole in plant breeding. *Planta* 243, 281-296.
- Schafhauser-Smith, K., Benfey, T.J., 2001. The reproductive physiology of three age classes of adult female diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 25, 319-333.

- Sellars, M.J., Degnan, B.M., Preston, N.P., 2006. Productions of triploid Kuruma shrimp, *Marsupenaeus (Penaeus) Japonicus* (Bate) nauplii through inhibition of polar body I, or polar body I and II extrusion using 6-dimethylaminopurine. *Aquaculture* 256, 337-345.
- Sheehan, R.J., Shasteen, S.P., Suresh, A.V., 1999. Better Growth in All-Female Diploid and Triploid Rainbow Trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 128, 491-498.
- Smith, L.T., Lemoine, H.L., 1979. Colchicine-induced Polyploidy in Brook Trout. *The progressive Fish-Culturist* 41(2), 86-88.
- Song, C., Liu, S., Xiao, J., He, W., Zhou, Y., Qin, Q., Zhang, C., Liu, Y., 2012. Polyploid organisms. *Science China Life Sciences* 55 (4), 301-311.
- Stanley, J.G., Allen, S.K., Hidu, H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with Cytochalasin B. *Aquaculture* 23, 1-10.
- Teskeredzic, E., Donaldson, E.M., Teskeredzic, Z., Solar, I.I., McLean, E., 1993. Comparison of hydrostatic pressure and thermal shock to induce triploidy in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 117, 47-55.
- Thorgaard, G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, W., Gall, G.A.E., Propp, J., Utter, F.M., 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometrie. *Aquaculture* 29, 305-309.
- Thorstad, E.B., Fleming, I.A., McGinnity, P., Soto, D., Wennevik, V., Whoriskey, F., 2008. Incidence and impacts of escaped farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in nature. NINA Special Report 36, 110 pp.
- Tiway, B.K., Kirubakaran, R., Ray, A.K., 2004. The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 14, 391-402.
- Trendowski, M., 2014. Exploiting the cytoskeletal filaments of neoplastic cells to potentiate a novel therapeutic approach. *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer* 1846(2), 599-616.
- Turan, F., Guragac, R., 2014. Induction of triploidy with caffeine treatment in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 13(4), 1014-1020.
- Turan, F., Guragac, R., Yigitarslan, D., Turan, C., 2012. A Preliminary Study on Induction of Triploidy by Caffeine Treatment in the Trout. *First National Workshop on Marine Biotechnology and Genomics*, 204-211.
- Van de Peer, Y., Mizrahi, E., Marchall, K., 2017. The evolutionary significance of polyploidy. *Nature reviews Genetics* 18, 411-424.
- Volff, J.N., 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* 94, 280-294.
- Wertheim, B., Beukeboom, L.W., van de Zande, L., 2013. Polyploidy in animals: Effect of gene expression on sex determination, evolution and ecology. *Cytogenetic and Genome Research* 140, 256-269.
- Wittmann, M.E., Jerde, C.L., Howeth, J.G., Maher, S.P., Deines, A.M., Jenkins, J.A., Whitley, G.W., Burbank, S.R., Chadderton, W.L., Mahon, A.R. et al., 2014. Grass carp in the Great Lakes region: establishment potential, expert perceptions, and re-evaluation of experimental evidence of ecological impact. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 71, 1-8.
- Wong, T., Zohar, Y., 2015. Production of productively sterile fish: A mini-review of germ cell elimination technologies. *General and Comparative Endocrinology* 221, 3-8.
- Zhang, N., Bao, Y., Xie, Z., Huang, X., Sun, Y., Feng, G., Zeng, H., Ren, J., Li, Y., Xiong, J. et al., 2019. Efficient Characterization of Tetraploid Watermelon. *Plants* 8, 419-429.
- Zhang, G., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Shen, J., Wang, Y., 1998. Triploidy induction in Pacific oyster *Crassostrea gigas* by caffeine with thermal shock. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 16, 249-255.

Zhang, Y., Wang, B., Qi, S., Dong, M, Wang, Z., Li, Y., Chen, S., Li, B., Zhang, J., 2019. Ploidy and hybridity effect on leaf size, cell size and related genes expression in triploids, diploids and their parents in *Populus*. *Planta* 249, 635-646.

Zhou, L., Gui, J., 2017. Natural and artificial polyploids in aquaculture. *Aquaculture and Fisheries* 2, 103-111.