

Ryby akwariowe w badaniach naukowych

**Maciej Kamaszewski, Teresa Ostaszewska,
Dobrochna Adamek, Małgorzata Rzepkowska,
Jerzy Śliwiński, Natalia Mroczek-Sosnowska,
Robert Kasprzak, Magdalena Fajkowska**

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Tradycja utrzymywania ryb ozdobnych w przydomowych zbiornikach sięga czasu rozkwitu starożytnego Sumeru (około 2500 lat p.n.e.), natomiast utrzymywanie ryb w specjalnych pojemnikach oraz początek ukierunkowanej selekcji datuje się na okres panowania dynastii Yuan w Chinach [3]. W tym okresie prowadzono selekcję, przede wszystkim ze względu na kolor ciała, karasia złocistego (*Carassius auratus*). Współczesna akwarystyka zaczęła się intensywnie rozwijać w drugiej połowie XIX wieku, kiedy do Europy, a następnie do Ameryki Północnej, zaczęto sprowadzać różne gatunki ryb z całego świata. Od tamtej pory wiele gatunków ryb jest rozmnażanych i prowadzi się ich ukierunkowaną selekcję. Dlatego niektóre gatunki utrzymywane w akwariach można uznać za udomowione [3].

Ryby akwariowe są obiektem chowu i hodowli w domowych zbiornikach na całym świecie. Popularność tego hobby powoduje, że rozwinęła się akwakultura ryb ozdobnych oraz przemysł produkujący niezbędne akcesoria, preparaty i pasze, konieczne do utrzymania ryb w akwariach. Poznanie biotechnik rozrodu i podchowu wielu gatunków ryb akwariowych pozwoliło na ochronę ich naturalnych populacji. Jednakże, niektóre gatunki dostępne w sklepach i hurtowniach akwarystycznych nadal pochodzą z odłowu ze środowiska naturalnego. Eksport ryb ozdobnych w niektórych krajach świata stał się ważną gałęzią gospodarki. Wszystkie te aspekty wpłynęły na rozwój branży, która w ostrożnych szacunkach może generować zyski rzędu kilku miliardów dolarów amerykańskich rocznie [6].

Od wielu lat obserwowany jest wzrost udziału ryb, zwłaszcza popularnych gatunków akwariowych, w badaniach naukowych. Ryby stały się powszechnie wykorzystywane w nauce jako zwierzęta modelowe, stanowiąc alternatywę dla doświadczeń *in vivo* wykonywanych na ssakach. Jak wskazują Schaeck i wsp. [26], w Wielkiej Brytanii w 2006 roku wykonano 270 000 procedur naukowych z wykorzystaniem ryb jako zwierząt modelowych, natomiast w 2011 roku już 563 903 i liczba ta stale rośnie. Ryby, które obecnie stanowią blisko połowę współczesnie żyjących kręgowców, są dobrym modelem do badań podstawowych i biomedycznych. Przez ponad 300 milionów lat linie różnych grup systematycznych ryb i czworonogów (*Tetrapoda*) ewoluowały niezależnie. Jednakże, wiele aspektów biologii organizmów z tych dwóch grup charakteryzuje się podobnymi mechanizmami fizjologicznymi [2]. Powstała koncepcja modelowych mutantów ewolucyjnych, która wyjaśnia, że w toku ewolucji, podczas przystosowania się gatunku lub populacji lokalnych różnych gatunków zwierząt (także ryb) do warunków środowiska pojawiły się fenotypy podobne lub naśladujące podobne rozwiązania ewolucyjne (przykład paralelizmu ewolucyjnego). Dlatego też obserwuje się pojawienie podobnych fenotypów u ryb i ssaków, np. patologie, lub specyficznych mechanizmów detoksyfikacji [1]. Jak sugeruje Schartl [27], ogromna liczba gatunków opisanych naukowo ryb, która co roku się powiększa, sprawia, że istnieje wysokie prawdopodobieństwo znalezienia nowego modelu ewolucyjnego, który

pozwole na zrozumienie i opracowanie strategii diagnozy i leczenia różnych chorób człowieka. Oczywiście, nowe gatunki ryb modelowych znajdują zastosowanie nie tylko w badaniach medycznych, ale także w ekologii, toksykologii, farmakologii, genetyce, embriologii i innych [4]. Wśród tej grupy ryb znalazło się wiele gatunków utrzymywanych w akwariach. To właśnie dzięki łatwości w chowie oraz dobrze poznanym technikom rozrodu, niektóre ryby akwariowe są ważnymi zwierzętami modelowymi w nauce. Ważnym aspektem wpływającym na popularność tych kręgowców, jako zwierząt wykorzystywanych w badaniach naukowych, jest także sam rozwój metod badawczych oraz wykorzystanie transgenicznych linii w badaniach modelowych. Ponadto, światowym trendem jest wdrożenie procedur bioetycznych wraz z zasadą 3R: Replacement (zastąpienie zwierząt gatunkami modelowymi mniej odczuwającymi ból), Reduction (zmniejszenie liczby zwierząt używanych w doświadczeniu), Refinement (udoskonalanie metod w celu ograniczenia cierpienia zwierząt doświadczalnych). Dlatego prowadzone są na świecie działania, które zmierzają do ograniczenia liczby ssaków wykorzystywanych w badaniach naukowych, a gdzie jest to możliwe, ich miejsce zajmują różne gatunki ryb modelowych.

Najczęściej wykorzystywanym w badaniach naukowych gatunkiem jest pochodzący z południowej części Azji, należący do rodziny karpiowatych (*Cyprinidae*) danio pręgowany (*Danio rerio*). Łatwość chowu i rozrodu danio, a także wysoka płodność i niewielkie rozmiary spowodowały, że w latach 70. ubiegłego stulecia George Streisinger zakupił w sklepie zoologicznym w Albany w Oregonie (USA) osobniki tego gatunku, które rozmnożył i wprowadził znaną na całym świecie linię AB [14]. Od tamtej pory prowadzone są badania nad możliwościami wykorzystania tego gatunku w badaniach naukowych. Przełomem były lata 90. XX wieku, kiedy szczegółowo opisano rozwój embrionalny i larwalny danio pręgowanego [19]. Pozwoliło to na walidację warunków chowu tego gatunku w warunkach laboratoryjnych, dzięki czemu uzyskano powtarzalność wyników doświadczeń oraz popularyzację tego modelu na świecie. W latach 90. XX wieku otrzymano także pierwsze linie danio pochodzące z mutacji gatunku. Kolejnym krokiem milowym w rozwoju popularności danio pręgowanego jako gatunku modelowego było zsekwencjonowanie genomu [13] oraz powstanie licznych linii transgenicznych, obecnie wykorzystywanych w badaniach naukowych. W celu utrzymania oraz udostępniania linii dzikich, licznych mutantów i linii transgenicznych danio pręgowanego zostały stworzone centra badawcze: Zebrafish International Resource Center (ZIRC) w University of Oregon oraz European Zebrafish Resource Center (EZRC) w Institute of Toxicology and Genetics w Eggenstein-Leopoldshafen.

Danio pręgowane jest gatunkiem wykorzystywanym w badaniach medycznych, szczególnie dotyczących nowotworów [2] oraz procesów starzenia [10, 18]. Jak wskazuje Langheinrich [22], wiele szlaków fizjologicznych jest regulowanych przez konserwatywne ewolucyjnie czynniki, dzięki czemu około 70% wszystkich genów związanych z ludzkimi chorobami ma funkcjonalne homologii u tego gatunku ryby. Dlatego danio pręgowane jest obiecującym gatunkiem do prowadzenia badań modelowych związanych z chorobami, zwłaszcza chorobami cywilizacyjnymi, ale także do badań związanych z ryzykiem zachorowań w momencie ekspozycji na zanieczyszczenia w środowisku [12, 32]. Procedury prowadzenia testów toksykologicznych z wykorzystaniem embrionów danio pręgowanego zostały szczegółowo opisane, wystandaryzowane oraz wdrożone [24], dzięki czemu wyniki uzyskane w różnych laboratoriach są porównywalne. Danio pręgowane, jako gatunek modelowy, ma szereg zalet, które są bardzo ważne z punktu widzenia naukowców. Ryba ta jest łatwa w hodowli, a utrzymanie jej nie jest kosztochłonne. Charakteryzuje się ona szybkim rozwojem zarodkowym, a embriony mają transparentny cho-

rion, co znacznie ułatwia obserwacje mikroskopowe. Ryby są płodne, a dojrzałość płciową uzyskują w ciągu 3-4 miesięcy [5, 12, 30]. Wszystkie te zalety oraz wykorzystanie tego gatunku w badaniach modelowych spowodowały, że w myśl ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych [34], danio przegrywany w Polsce stał się, jako pierwsza ryba, zwierzęciem laboratoryjnym.

Drugim powszechnie wykorzystywanym w nauce gatunkiem ryb akwariowych jest ryżanka japońska (*Oryzias latipens*). Jest to niewielki gatunek ryby z rodziny kaczorkowatych (*Adrianichthyidae*), pochodzący z Dalekiego Wschodu, głównie obszaru Japonii, Półwyspu Koreańskiego oraz Chin. Łatwość chowu i hodowli oraz dostępność licznych linii hodowlanych spowodowała, że gatunek ten jest często wykorzystywany w badaniach biomedycznych [27]. Ryżanka japońska, znana również pod spolszczoną angielską nazwą medaka, ma zsekwencjonowany genom [17] oraz liczne linie hodowlane, uzyskane na drodze selekcji pojawiających się mutacji bądź transgeniczne. Podobnie jak dla danio przegrywanego, tak również dla tego gatunku powstało centrum badawcze National BioResource Project (NBRP) Medaka, znajdujące się w Myodaiji, Okazaki, w japońskiej prefekturze Aichi. W przypadku medaki szczególnie interesująca jest możliwość analizowania przebiegu chorób ludzkich związanych z płcią. Ryżanka japońska posiada chromosomy płci i wiele genów odpowiadających za mutacje w ludzkich komórkach nowotworowych (HRAS), charakteryzuje się poziomem identyczności powyżej 95% w odpowiadających genach u tego gatunku [27]. Jak wykazują wyniki ostatnich badań, ryżanka japońska jest dobrym modelem do badań przebiegu osteoporozy zależnej od wieku i płci, ponieważ – w odróżnieniu np. od gryzoni – u medaki występują wahania poziomu estrogenów we krwi, podobnie jak u kobiet, i dobrze odzwierciedlają okres menopauzy [31]. Do zalet tego gatunku ryby akwariowej jako gatunku modelowego należy także zaliczyć łatwość chowu i rozrodu, krótki rozwój pokolenia oraz przezroczyste choriony embrionów [27]. Wszystkie te cechy powodują, że jest wykorzystywana w wielu pracach badawczych z zakresu embriogenezy, toksykologii, fizjologii czy medycyny. Jest to również pierwszy kręgowiec, którego rozród oraz embriogenezę analizowano w warunkach nieważkości [15].

Pośród ryb z rodziny piękniczkowatych (*Poeciliidae*), popularnej wśród akwarystów, wiele gatunków jest wykorzystywanych w badaniach naukowych. Są to ryby bardzo łatwe w utrzymaniu, odporne na niekorzystne warunki środowiska i płodne. Wszystkie gatunki ryb z tej rodziny są jajożyworodne, reprezentują żyworodność lecytroficzną. Jednym z gatunków jest gupik (*Poecilia reticulata*), popularna ryba akwariowa na całym świecie. Ryba ta powszechnie wykorzystywana jest w badaniach genetycznych, jako model do badań nad dryfem genetycznym, heterozją, inbredem itp. [23]. Gatunek ten po raz pierwszy był wykorzystany w doświadczeniach naukowych już w pierwszych dziesięcioleciach XX wieku [29]. Jest to pierwszy gatunek, u którego stwierdzono powiązanie chromosomu Y z dziedziczeniem niektórych cech [36]. Innymi rybami piękniczkowatymi wykorzystywanymi w badaniach naukowych są gatunki z rodzaju *Xiphophorus*, zwłaszcza dobrze znane akwarystom: mieczyk Hellera (*Xiphophorus helleri*) oraz zmienniak plamisty, zwany platką (*Xiphophorus maculatus*). Oba gatunki mogą krzyżować się ze sobą, dzięki czemu w handlu są dostępne także mieszańce międzygatunkowe. Jest to również jeden z najstarszych znanych nauce modeli zwierzęcych wykorzystywanych w badaniach nad nowotworami. Już w pod koniec lat 70. XX wieku Kollinger i wsp. [21] opisali możliwość wywołania nowotworów, czerniaka i nerwiaka, u ryb z rodzaju *Xiphophorus* poprzez ekspozycję w wodnych roztworach substancji kancerogennych. Mieczyk i plątka oraz ich mieszańce zaliczane są do modelowych mutantów ewolucyjnych, ponieważ złośliwe nowotwory skóry u tych ryb rozwijają się z naturalnie występujących du-

zych plam pigmentowych, podobnie jak u człowieka. Tak jak u ludzi, ten typ nowotworu jest wywołany przez zmianę ekspresji genów [2]. Genom tych ryb został zsekwencjonowany [28], a materiał badawczy jest przechowywany w Genetic Stock Center w Texas State University.

Do rzędu karpieńcokształtnych (*Cyprinodontiformes*), oprócz wspomnianych wcześniej ryb piękniczkowatych, należą również ryby obecnie zaliczane do rodziny *Nothobranchiidae*, która grupuje znane akwarystom afrykańskie ryby karpieńcowate (*Cyprinodontidae*). Są to gatunki rzadziej utrzymywane w akwariach, często mające wyższe wymagania co do warunków środowiskowych. Obiecującym modelem do badania zmian zachodzących podczas starzenia są, wywodzące się z obszarów afrykańskiej sawanny, zagrzebki (*Nothobranchius* sp.). Zagrzebka (*Nothobranchius furzeri*) zaliczana jest do gatunków sezonowych, u których ikra do prawidłowego rozwoju wymaga przesuszenia, związanego z porą suchą. Po ponownym napełnieniu się zbiorników wodnych, na początku pory wilgotnej, wystarczy kilka tygodni, by zagrzebki przeprowadziły swój cykl życiowy. Po zakończeniu pory suchej naturalne zbiorniki wysychają, a dorosłe osobniki giną. Ten specyficzny szybki rozwój larw oraz krótki okres życia tych ryb jest wykorzystywany w badaniach nad procesem starzenia [33]. Wyprawdzono liczne linie zagrzebki *Nothobranchius furzeri*, której długość życia, od wyklucia do naturalnej śmierci, waha się między 10 a 31 tygodni. Proces starzenia się tych ryb, podobnie jak u ludzi, wiąże się ze zmniejszoną płodnością, zmniejszeniem możliwości poznawczych, ekspresją czynników zależnych od wieku i zwiększoną śmiertelnością. Jest to na razie nowy model badawczy, który dopiero jest rozpowszechniany w świecie nauki. Do tej pory określono *loci* umożliwiające kontrolę długości życia, które można zmapować używając do tego analizy identyfikacji genów cech ilościowych (Quantitative Trait Loci – QTL) [20].

Jedną z najpopularniejszych wśród akwarystów rodzin są pielęgnicowate (*Cichlidae*). Jest to rodzina, do której zaklasyfikowano liczne gatunki, niekiedy charakteryzujące się specjalnymi adaptacjami w zakresie morfologii i fizjologii, umożliwiającymi zajęcie specyficznych nisz ekologicznych. Cechą typową dla tych ryb jest zróżnicowanie budowy czaszki i zębów, w zależności od preferencji żywieniowych. Jak wskazuje Albertson i wsp. [1], pojawiające się u ryb pielęgnicowatych zaburzenia rozwoju głowy, a w szczególności kości otworu gębowego i zębów, mogą być modelem do analiz chorób twarzoczaszki u ludzi. Jak wykazali Roberts i wsp. [25], u endemicznych pielęgnic z jeziora Malawi za adaptacyjną zmienność budowy szczęk tych ryb odpowiada gen Patched-1 (*Ptc-1*). Również u ssaków stwierdzono zaangażowanie tego genu w rozwój górnej szczęki, dlatego zmiany w ekspresji tego genu, lub jego mutacje, mogą powodować zaburzenia w budowie twarzoczaszki u ludzi [7, 38]. Obecnie, potencjalne wykorzystanie pielęgnic w badaniach biomedycznych podlega weryfikacji.

Bardzo charakterystyczną rybą akwariową jest należący do ryb kłasczowatych (*Characidae*) ślepczyk jaskiniowy, zamieszkujący jaskinie środkowego Meksyku. Jest to podgatunek lustrzenia meksykańskiego (*Astyanax mexicanus*), który bytuje w rzekach Meksyku. Dorosłe ślepczyki jaskiniowe są pozbawione oczu, natomiast w fazie larwalnej są normalnie ukształtowane. Podczas rozwoju obserwuje się powoli postępującą degenerację oczu, soczewki i siatkówki, oraz utratę pigmentu w ciele. Ten specyficzny przykład ewolucji regresywnej lub neutralnej może być modelem do badań nad degradacją siatkówki i soczewki u ludzi [8, 27].

Oprócz omówionych gatunków ryb akwariowych, w badaniach naukowych można spotkać również inne gatunki ryb powszechnie utrzymywane w domowych zbiornikach. Jako ryby modelowe wykorzystywane są: karaś złocisty, brzanka różowa (*Pethia conchonius*), ryby z rodziny zbrojnikowatych (*Loricarii-*

dae), bojownik wspaniały (*Betta splendens*) i inne gatunki, jednakże nie są one obecnie tak często używane w badaniach naukowych jak wymienione wcześniej.

Obecnie nowym kierunkiem jest wykorzystanie w badaniach naukowych linii transgeniczných, przede wszystkim danio pręgowanego oraz ryżanki japońskiej. Pierwsze transgeniczne ryby, z wprowadzonym transgenem GFP (Green Fluorescent Protein), otrzymano w 1995 roku [11]. Od tego czasu są one wykorzystywane w badaniach biomedycznych oraz związanych z biologią rozwoju i w toksykologii środowiska [11, 37]. Bardzo prężny rozwój technik inżynierii genetycznej spowodował wyprowadzenie wielu linii transgeniczných ryb posiadających identyczne transgeny do znalezionych u innych zwierząt modelowych, jak na przykład u gryzoni. Dzięki temu naukowcy mają nowy model do prowadzenia badań podstawowych, bez konieczności wykorzystywania ssaków jako zwierząt laboratoryjnych [37].

Transgeniczne linie ryb akwariowych są również obiektem chowu i hodowli w domowych akwariach. Do obrotu handlowego, początkowo w USA, potem w innych krajach na całym świecie, także w Polsce, zostały dopuszczone transgeniczne linie danio pręgowanego, żalobniczki (*Gymnocorymbus ternetzi*) oraz brzanki sumatrzeńskiej (*Puntigrus tetrazona*). Transgeniczne formy tych gatunków zostały opatentowane i sprzedawane są pod handlową nazwą GloFish. Oprócz samych zwierząt transgeniczných, prawnie chronione są także zestawy akwariowe przeznaczone do utrzymania tych ryb oraz systemy oświetlenia zbiorników, ze światłem białym i monochromatycznym. W ostatnich latach prowadzone są także badania nad wprowadzeniem do akwakultury ryb ozdobnych nowych gatunków ryb transgeniczných. Otrzymano między innymi linię z RFP (Red Fluorescent Protein) kardynalka chińskiego (*Tanichthys albonubes*) [16] oraz ryżanki (*Oryzias dancena*) z wprowadzonym transgenem CFP (Cyan Fluorescent Protein) [35]. Jednakże wprowadzenie nowych transgeniczných ryb wiąże się z ryzykiem potencjalnego wydostania się zmienionych genetycznie organizmów do środowiska naturalnego. Dlatego podejmowane są działania mające na celu ocenę ryzyka środowiskowego (ERA – Environment Risk Assessment) w przypadku wydostania się ryb transgeniczných do środowiska naturalnego oraz określenia potencjalnych dróg rozprzestrzeniania się osobników transgeniczných w środowisku [9].

Rozwój badań biomedycznych i toksykologicznych wymaga wykorzystania zwierząt laboratoryjnych. Opanowanie biotechnik rozrodu nowych gatunków utrzymywanych amatorsko w zbiornikach domowych może pozwolić na popularyzację i lepsze poznanie ich biologii. Tym samym mogą zostać opisane nowe modelowe mutanty ewolucyjne. Na podstawie przedstawionego krótkiego przeglądu literatury można stwierdzić, że udział ryb akwariowych w tego typu doświadczeniach będzie systematycznie wzrastał.

Literatura: 1. Albertson R.C., Cresko W., Detrich H.W., Postlethwait J.H., 2009 – Evolutionary Mutant Models for Human Disease. Trends Genet. 25 (2), 74-81. 2. Amatruda J.F., Shepard J.L., Stern H.M., Zon L.I., 2002 – Zebrafish as a cancer model system. Cancer Cell 1, 229-231. 3. Balon E.K., 2004 – About the oldest domesticates among fishes. J. Fish Biol. 65, 1-27. 4. Bolis C.L., Piccolella M., Dalla Valle A.Z., Rankin J.C., 2001 – Fish as model in pharmacological and biological research. Pharmacol. Res. 44 (4), 265-280. 5. Braunbeck T., Kais B., Lammer E., Otte J., Schneider K., Stengel D., Strecker R., 2015 – The fish embryo test (FET): origin, applications, and future. Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (21), 16247-16261. 6. Capps K.A., Flecker A.S., 2013 – Invasive aquarium fish transform ecosystem nutrient dynamics. Proc. R. Soc. B. 280: 20131520. 7. Cobourne M.T., Green J.B., 2012 – Hedgehog signalling in development of the secondary palate. Front. Oral Biol. 16, 52-59. 8. Duboué E.R., Borowsky R.L., Keene A.C., 2012 – β -adrenergic signaling regulates evolutionarily derived sleep loss in the Mexican cavefish. Brain Behav. Evol. 80, 233-243. 9. Espinoza C.S., 2012 – Breeding and reproduction of transgenic fish fluorescent in

captivity: a prospective scope. Scientia Agropecuaria 1, 89-93. 10. Gerhard G.S., 2007 – Small laboratory fish as models for aging research. Ageing Res. Rev. 6, 64-72. 11. Gong Z., Ju B., Wan H., 2001 – Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. Genetica 111, 213-225. 12. Hollert H., Keiter S.H., 2015 – Danio rerio as a model in aquatic toxicology and sediment research. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 16243-16246. 13. Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L. i wsp., 2013 – The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature 496, 498-503. 14. <https://zfinfo.org/ZDB-GENO-960809-7>. 15. Ijiri K., 2003 – Life-cycle experiments of medaka fish aboard the international space station. Adv. Space Biol. Med. 9, 201-216. 16. Jian Q., Chen M., Bai J.-j., Jiang P., Fan J.-j., Ye X., Xia S.-l., 2012 – Generation and characterization of a stable red fluorescent transgenic *Tanichthys albonubes* line. Afr. J. Biotechnol. 11 (30), 7756-7765. 17. Kasahara M., Naruse K., Sasaki S., Nakatani Y., Qu W., Ahsan B., Yamada T. i wsp., 2007 – The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. Nature 447, 714-719. 18. Keller E.T., Murtha J.M., 2004 – The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. Comp. Biochem. Physiol. C 138, 335-341. 19. Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F., 1995 – Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. Dev. Dynam. 203, 255-310. 20. Kirschner J., Weber D., Neuschl C., Franke A., Böttger M., Zielke L., Powalsky E. i wsp., 2012 – Mapping of quantitative trait loci controlling lifespan in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri* – a new vertebrate model for age research. Aging Cell 11, 252-261. 21. Kollinger G., Schwab M., Anders F.J., 1979 – Virus-like particles induced by bromodeoxyuridine in melanoma and neuroblastoma of *Xiphophorus*. Cancer Res. Clin. Oncol. 95, 239-246. 22. Langheinrich U., 2003 – Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. Bioessays 25, 904-912. 23. Nakajima M., Taniguchi N., 2001 – Genetics of the guppy as a model for experiment in aquaculture. Genetica 111, 279-289. 24. OECD, 2013 – Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Publishing, Paris. DOI: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264203709-en>. 25. Roberts R.B., Hu Y., Albertson R.C., Kocher T.D., 2011 – Craniofacial divergence and ongoing adaptation via the hedgehog pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 13194-13199. 26. Schaeck M., Van den Broeck W., Hermans K., Decostere A., 2013 – Fish as Research Tools: Alternatives to In Vivo Experiments. ATLA 41, 219-229. 27. Schartl M., 2014 – Beyond the zebrafish: diverse fish species for modeling human disease. Dis. Models Mech. 7, 181-192. 28. Schartl M., Walter R.B., Shen Y., Garcia T., Catchen J., Amores A., Braasch I. i wsp., 2013 – The genome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, provides insights into evolutionary adaptation and several complex traits. Nat. Genet. 45, 567-572. 29. Schmidt J., 1919 – Racial studies in fishes: II. experimental investigations with *Lebistes reticulatus* (Peters) Regan. J. Genet. 8, 147-153. 30. Scholz S., Fischer S., Gundel U., Kuster E., Luckenbach T., Voelker D., 2008 – The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. Environ. Sci. Pollut. Res. 15, 394-404. 31. Shanthanagouda A.H., Guo B.-S., Ye R.R., Chao L., Chiang M.W.L., Singaram G., Cheung N.K.M., Zhang G., Au D.W.T., 2014 – Japanese medaka: a non-mammalian vertebrate model for studying sex and age-related bone metabolism in vivo. PLoS ONE 9 (2), e88165. DOI:10.1371/journal.pone.0088165. 32. Strähle U., Scholz S., Geisler R., Greiner P., Hollert H., Rastegar S., Schumacher A., Selderslaghs I., Weiss C., Witters H., Braunbeck T., 2012 – Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. Reprod. Toxicol. 33, 128-132. 33. Terzibasi E., Valenzano D.R., Cellerino A., 2007 – The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. Exp. Gerontol. 42, 81-89. 34. Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. z 2015 r., poz. 266). 35. Vu N.T., Cho Y.S., Lee S.Y., Kim D.S., Nam Y.K., 2014 – A cyan fluorescent protein gene (cfp)-transgenic marine medaka *Oryzias dancena* with potential ornamental applications. Fish Aquat. Sci. 17 (4), 479-486. 36. Winge O., 1927 – The location of eighteen genes in *Lebistes reticulatus*. J. Genet. 18, 1-43. 37. Winn R.N., 2001 – Transgenic Fish as Models in Environmental Toxicology. ILAR Journal 42 (4), 322-329. 38. Young N.M., Chong H.J., Hu D., Hallgrímsson B., Marcucio R.S., 2010 – Quantitative analyses link modulation of sonic hedgehog signaling to continuous variation in facial growth and shape. Development 137, 3405-3409.