

Ministerstwo Rolnictwa
i Rozwoju Wsi



INNOWACJE W NOWOCZESNEJ PRODUKCJI RYB

WIEDEŃ, 19-20 WRZEŚNIA 2023



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki





INSTYTUT RYBACTWA
ŚRÓDLĄDOWEGO
IM. STANISŁAWA SAKOWICZA
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

NATIONAL INLAND
FISHERIES
RESEARCH INSTITUTE

Dariusz Kaczmarczyk

Bazy danych genetycznych ryb i ich zastosowanie w ochronie ryb wędrownych

Aquaculture Europe, Vienna, 2023



10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 10
tel.: +48 89 524 01 71
e-mail: irs@infish.com.pl
www.infish.com.pl

Ryby wędrowne

- ważny składnik bioróżnorodności organizmów wodnych
- szczególnie zagrożone konsekwencjami zabudowy hydrotechnicznej oraz zmianami w środowisku wodnym

Cykl życiowy ryb wędrownych (łososie i jesiotry)



- coraz bardziej zależne od człowieka
- istotne w gospodarce i rekreacji

Ochrona ryb wędrownych

Obszar zainteresowania biologii konserwacyjnej

A. Działania na poziomie środowiska:

poprawa czystości wody,
usuwanie barier w rzece,
odtworzenie dróg wędrówki i tarlisk,
zwalczanie gatunków inwazyjnych i kłusownictwa.

B. Działania na poziomie populacji:

produkcja i podchów materiału zarybieniowego w warunkach akwakultury,
zasilanie chronionych populacji materiałem uzyskanym w warunkach akwakultury,
zachowanie różnicowania genetycznego populacji - jako podstawy jej żywotności.

Ochrona ryb wędrownych – ocena efektów

Odpowiedzi na pytania w tym:

1. pochodzenie ryb – naturalne lub zarybienia,
2. zróżnicowanie genetyczne populacji,
3. zmiany charakterystyk genetycznych populacji w wyniku prac ochronnych.

Zastosowanie baz danych genetycznych ryb może być pomocne w odpowiedzi na te i szereg innych pytań.

Cel warsztatu

- A. Prezentacja i omówienie elementów składowych baz profili genetycznych ryb.
- B. Opis możliwości użycia baz profili genetycznych w ochronie jesiotrów.
- C. Bazy profili genetycznych w doborze osobników w pary lub grupy tarłowe
Prezentacja programu Genassemblage 2.2.
- D. Zastosowanie baz genetycznych i programu Genassemblage 2.2 w gospodarowaniu zasobami kriokonserwowanego nasienia chronionych populacji ryb.

Baza danych genetycznych

Jest zbiorem charakterystyk genetycznych (profilu) grupy osobników (tarlaków, selektów lub materiału zarybieniowego),

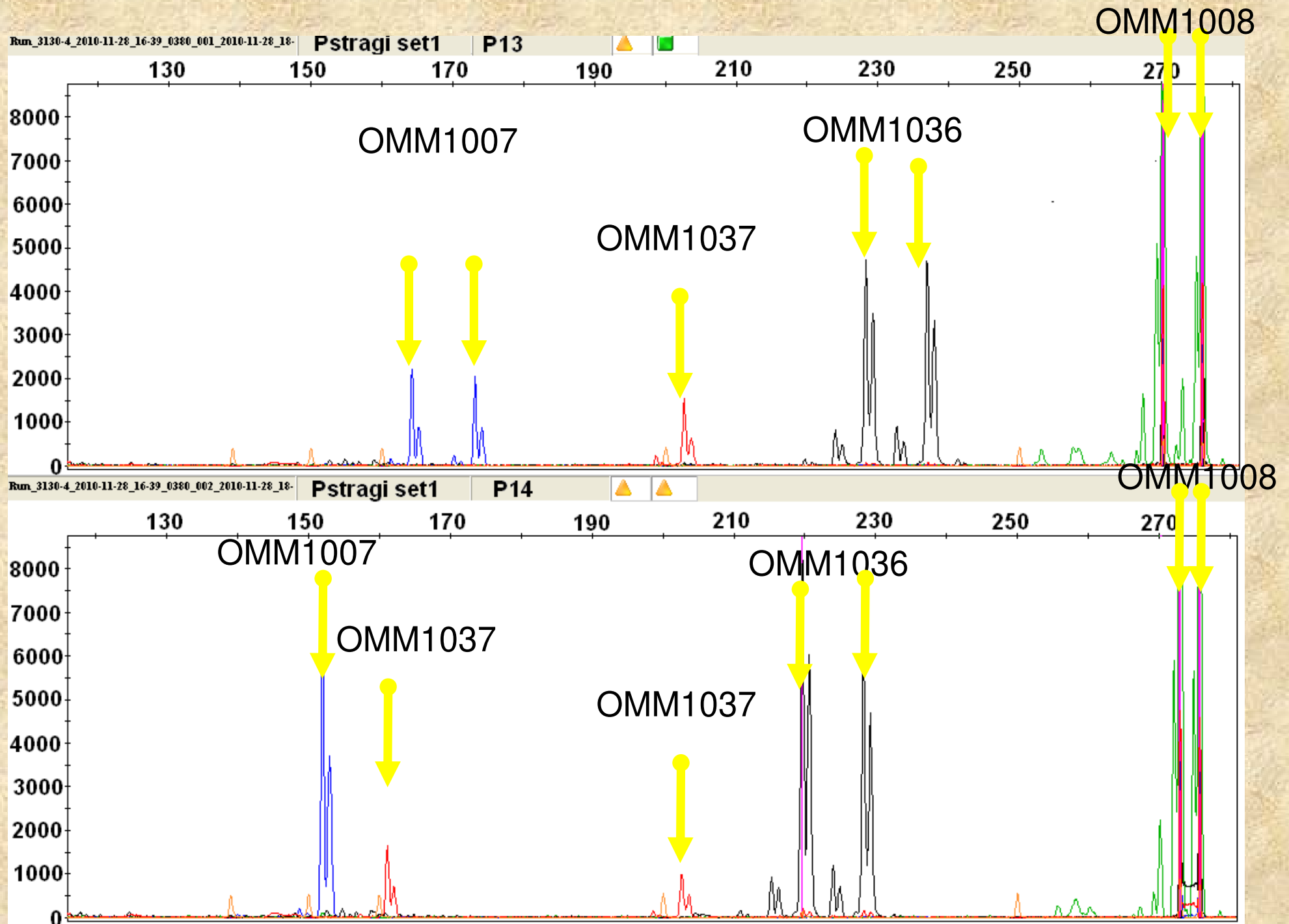
Profile genetyczne osobników są tworzone poprzez badania różnic długości lub sekwencji nukleotydowej odcinków DNA (markerów genetycznych),

Markerem genetycznym użytecznym w tworzeniu bazy genetycznej może być dowolny odcinek DNA w którym obserwujemy **polimorfizm genetyczny** (występowanie różnych wariantów długości lub sekwencji danego genu),

Struktura bazy jest otwarta, dostosowywana do danego typu zadania, rozbudowywana, aktualizowana,

Dostęp do bazy profili genetycznych poprzez np. serwery, udostępnienie naukowcom, jednostkom badawczym i instytucjom zaangażowanym w programy ochrony gatunkowej,

Na czym polega polimorfizm genetyczny?

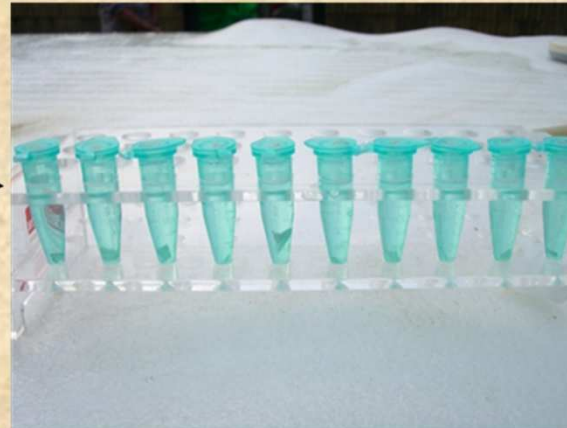


Przykładowy wynik rozdziału alleli loci mikrosatelitarnych pstrąga tęczęwego 8

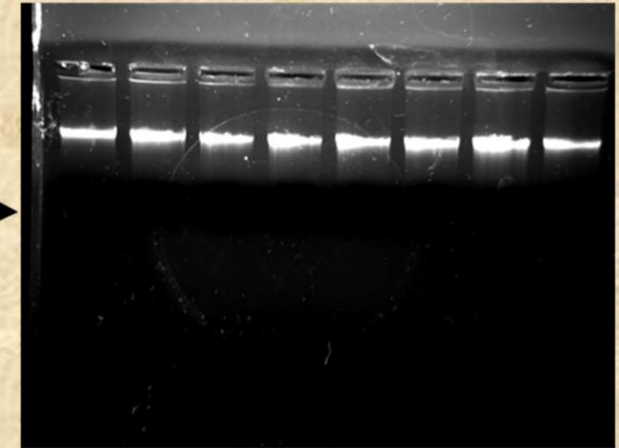
Etapy tworzenia bazy – badania molekularne



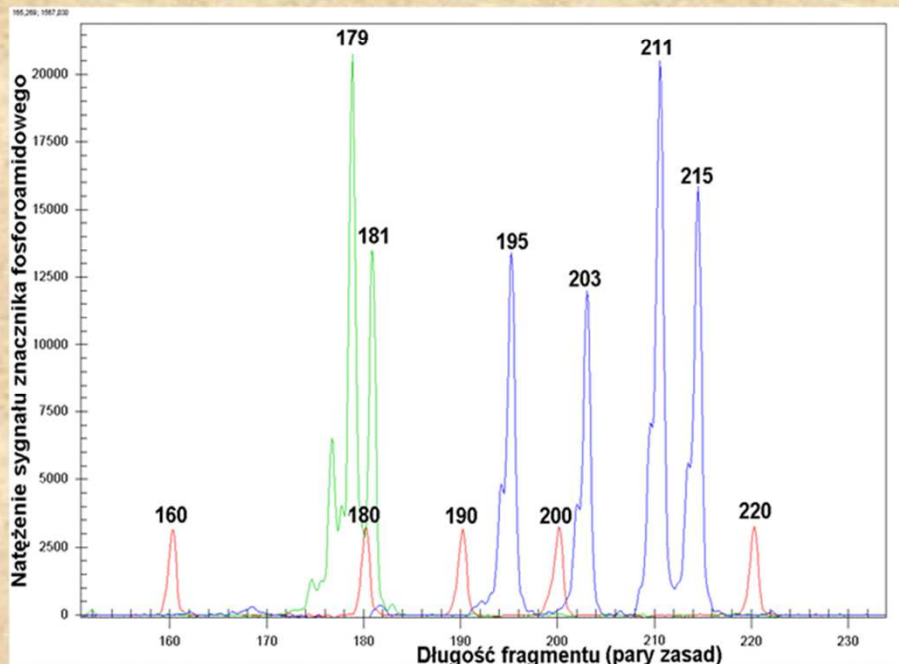
**Pobranie tkanki (fragment
płetwy 5-10mm²)**



Konserwacja tkanki



Izolacja DNA



Odczyt genotypów



Amplifikacja fragmentów DNA metodą PCR

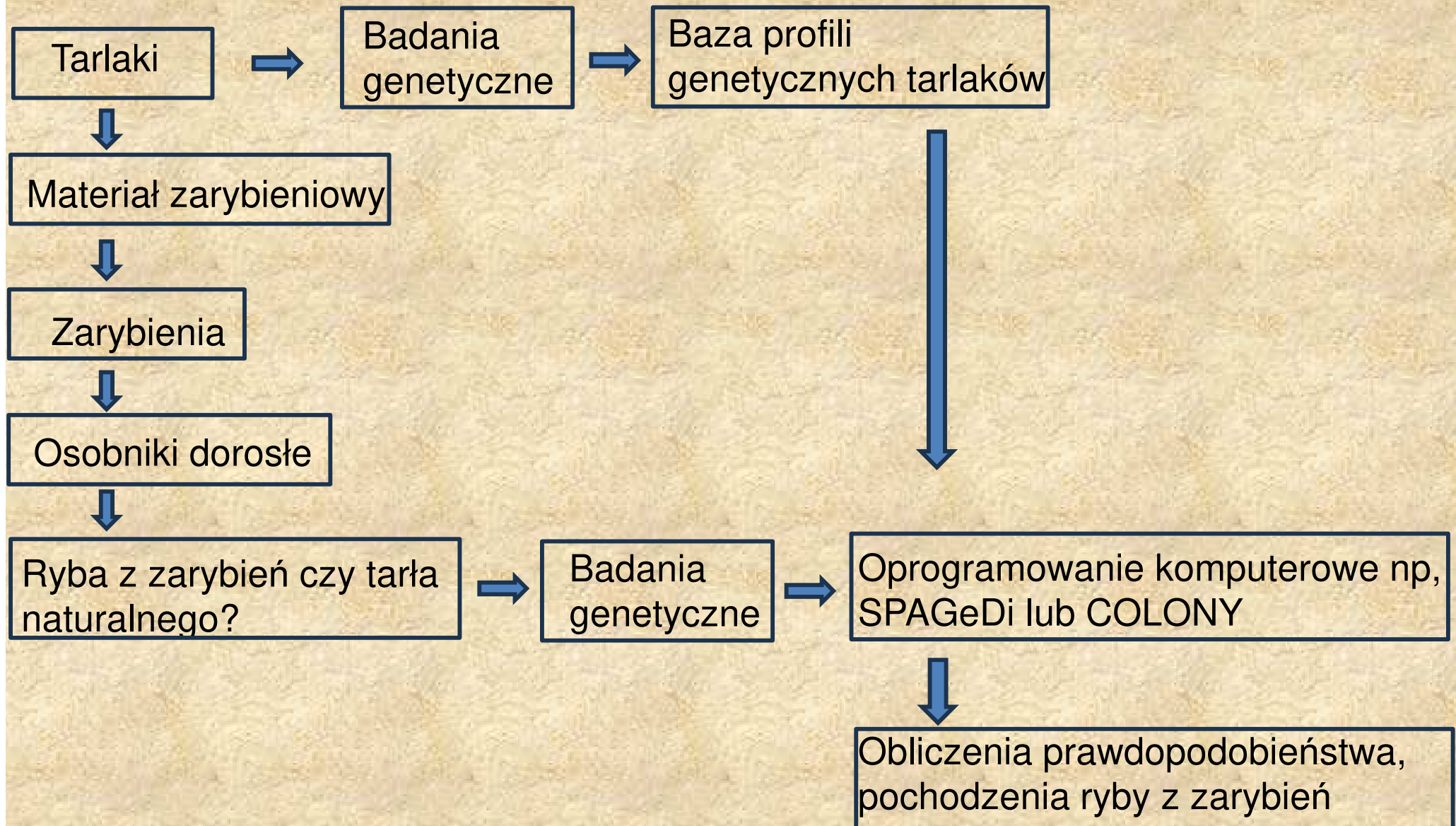
Etapy tworzenia bazy – profile genetyczne

Elementy składowe bazy danych genetycznych na przykładzie charakterystyk genetycznych tarlaków wiosłonosza amerykańskiego z ośrodka Pogórze

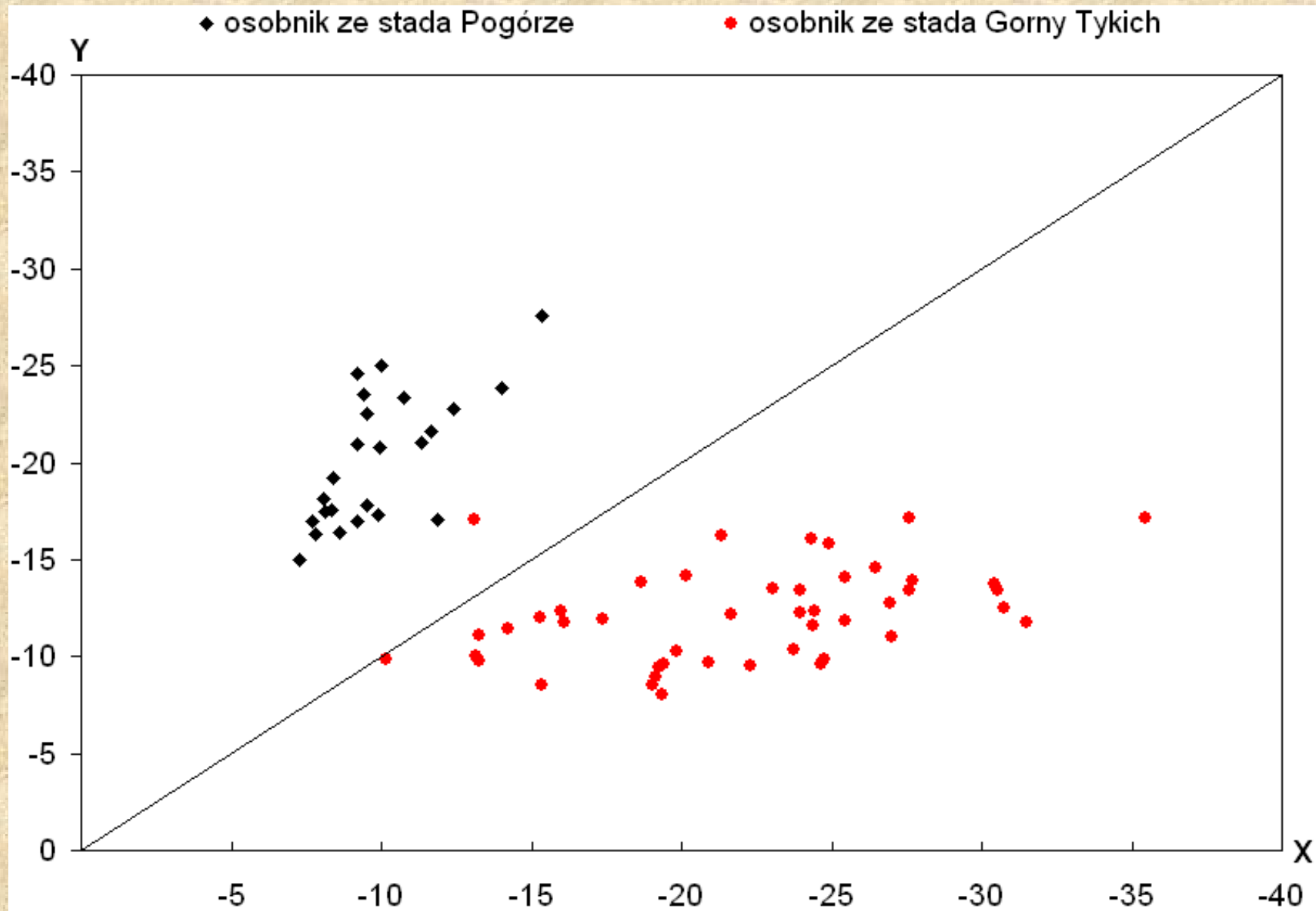
ryba			locus															
nr osobnika	płeć	nr znaczka	Psp18		Psp28		Psp26		Psp21		Psp20		Psp32		Psp29			
pog 1	♀	0633 31F7	170	170	250	250	138	152	150	152	208	210	179	181	195	203	211	215
pog 2	♀	0633 329C	170	170	244	246	136	138	146	150	208	210	181	181	195	203	211	215
pog 3	♀	0633 590A	170	170	244	246	138	142	146	150	208	210	181	181	195	203	211	211
pog 5	♀	0633 C4BE	170	170	244	246	136	142	150	152	210	210	181	181	195	203	211	215
pog 6	♀	0633 4AA4	170	170	230	254	136	142	146	152	208	210	181	181	195	203	211	215
pog 10	♀	0634 2D37	170	170	230	244	138	152	150	150	210	210	181	181	195	203	211	215
pog 14	♀	0635 FC74	170	170	244	246	138	142	150	150	210	210	181	181	195	195	211	211
pog 15	♀	0634 34B1	170	170	244	246	136	142	150	150	210	210	181	181	195	195	211	215
pog 16	♀	0634 1C42	170	170	230	254	138	142	150	152	210	210	179	181	195	195	211	215
pog 17	♀	0636 225B	170	170	230	244	138	142	150	150	210	210	179	181	195	203	211	215
pog 21	♀	0634 540F	170	170	230	254	138	152	150	150	208	208	179	181	195	203	211	215
pog 9	♂	0637 E64B	168	170	244	246	138	152	150	150	210	210	181	181	195	203	211	215
pog 13	♂	0636 0E12	170	170	246	254	136	142	146	150	208	210	179	181	195	203	211	215
pog 19	♂	0633 285E	170	170	246	254	138	138	150	150	208	210	181	181	195	203	211	215
pog 20	♂	0633 2E73	170	170	246	254	138	138	150	154	208	210	181	181	195	203	211	215
pog 22	♂	0633 3078	170	170	246	254	138	138	150	154	208	210	181	181	195	203	211	215
pog 23	♂	0636 213F	170	174	246	254	138	138	150	154	210	210	181	181	195	195	211	215
pog 24	♂	0633 5782	170	170	230	244	152	160	150	154	208	208	179	181	195	195	211	211
pozostałe dane	płeć i nr identyfikacyjny		dane zawierające genotypy przebadanych osobników															

Zastosowania baz danych genetycznych w ochronie ryb wędrownych

A. Szacowania prawdopodobieństwa pochodzenia złowionej ryby z zarybień lub tarła naturalnego



Weryfikacja pochodzenia na podstawie prawdopodobieństwa wystąpienia ryby o określonym genotypie w danym stadzie (Kaczmarczyk i in. 2012)



Wynik testu pokrewieństwa przeprowadzonego pomiędzy dwoma stadami rozrodczymi wioślonośa amerykańskiego Pogórze (PL) i Gorny Tykich (UA)

Weryfikacja pochodzenia na podstawie tzw. alleli własnych stad, populacji, lub gatunków ryb jesiotroształtnych

Zestawienie długości alleli charakterystycznych dla stad polskich wioślonośa amerykańskiego oraz stada ukraińskiego (Kaczmarczyk i in. 2012)

Locus	Długość alleli (pz)									
	214	216	218	220	222	170	172	174	208	210
<i>Psp 12</i>										
<i>Psp 18</i>										
<i>Psp 20</i>										
<i>Psp 21</i>										
<i>Psp 26</i>										
<i>Psp28</i>										
<i>Psp 29</i>										
<i>Psp 32</i>										

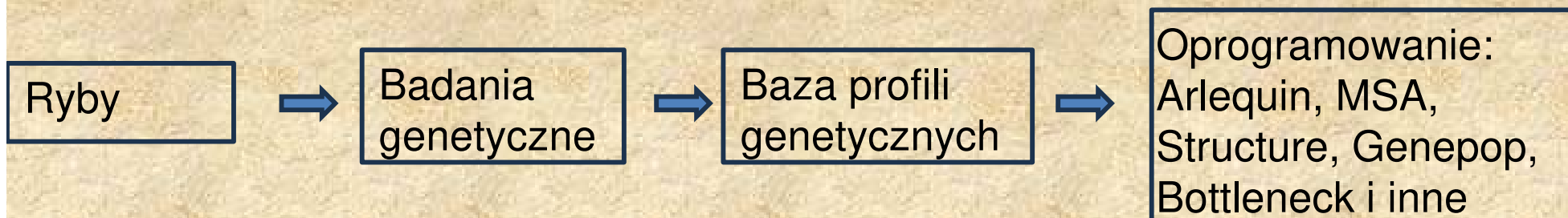
zielona czcionka – allele charakterystyczne dla stada Wąsosze i Gorny Tykich
 czerwona czcionka - allele charakterystyczne dla stad polskich
 czarna czcionka – allele wspólne dla trzech przebadanych stad

Zastosowania bazy danych genetycznych

B. Szacowanie zmienności genetycznej, efektu genetycznego gardła, współczynnika inbrodu i zgodności z równowagą H-W w populacjach lub stadach tarłowych

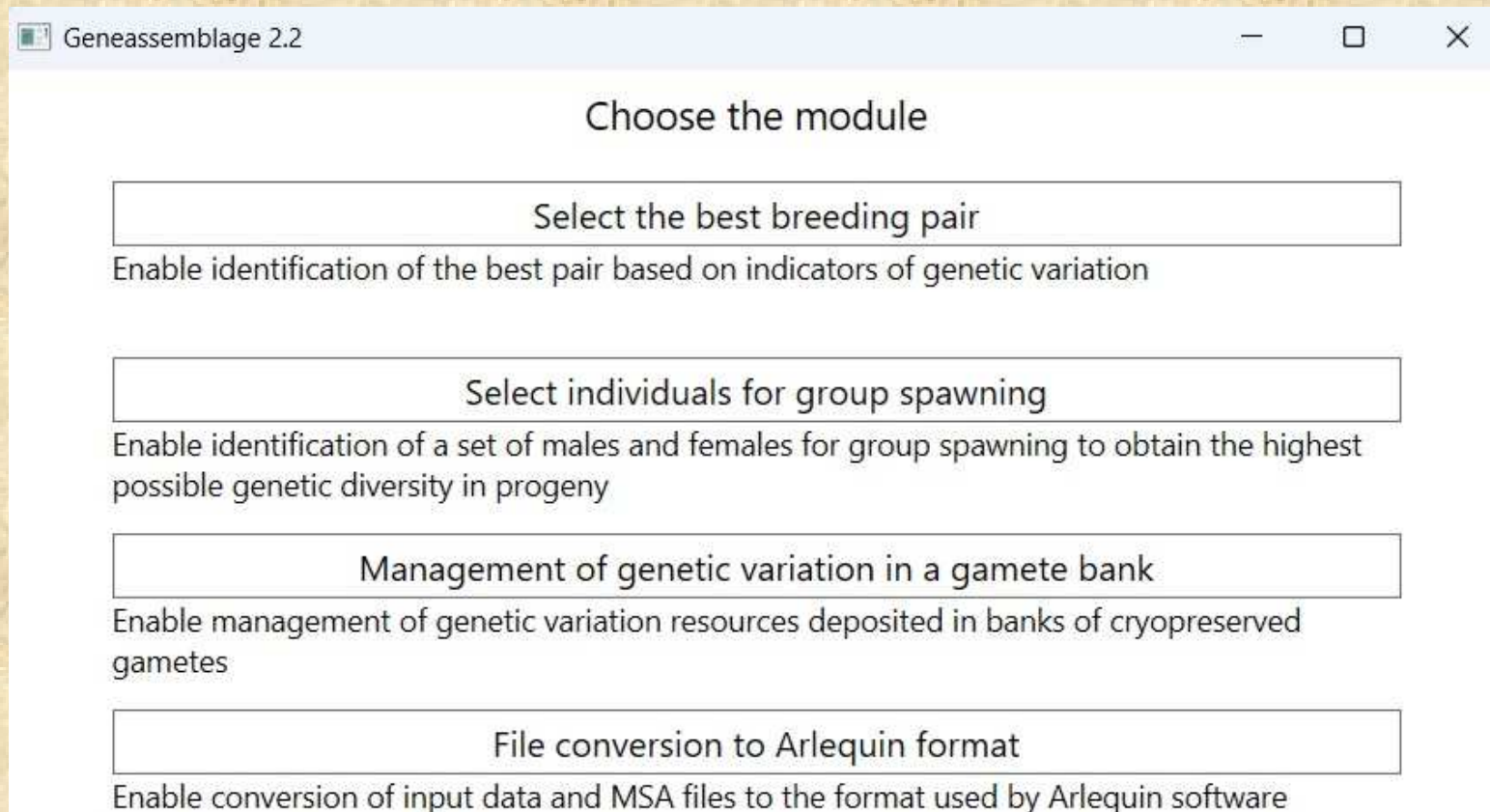
Bazy profili genetycznych można zastosować w:

- szacowaniu oraz opisie różnic genetycznych w obrębie stad tarłowych, populacji, oraz między nimi (zmienność genetyczna) w tym porównań z materiałem archiwalnym,
- monitorowaniu zmienności genetycznej populacji w tym szacowania efektu genetycznego wąskiego gardła oraz założyciela,
- oceny kondycji genetycznej populacji (równowaga H-W),
- szacowanie stopnia przekrzyżowania w sobie populacji (współczynnik inbrodu).



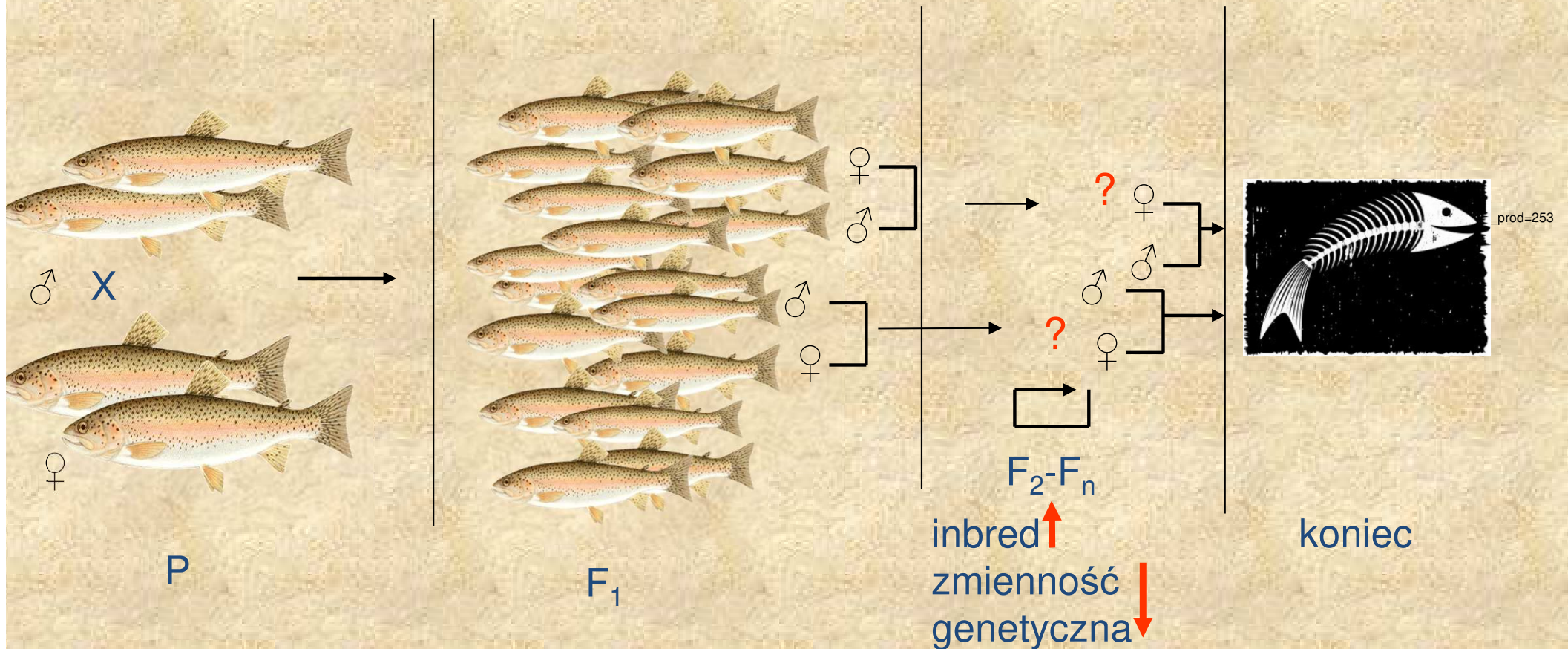
C. Bazy profili genetycznych w doborze osobników w pary lub grupy tarłowe - prezentacja zastosowania programu Genassemblage 2.2.

1. Moduł: Select the best breeding pair
2. Moduł: Select individuals for group spawning



Znaczenie doboru osobników do rozrodu

W ochronie gatunku konieczne jest unikanie kojarzeń wsobnych, zachowanie zmienności genetycznej stad tarłowych oraz chronionych populacji



Konsekwencje zarybienia osobnikami pochodzącymi od niewielkiej liczby osobników rodzicielskich i nieznannej charakterystyce genetycznej mogą być katastrofalne dla programów ochrony gatunkowej oraz akwakultury

Genassemblage 2.2

- program komputerowy przeznaczony do zarządzania zmiennością genetyczną,
- działa w środowisku Windows, ulepszona wersja Genassemblage 1.0,
- może być stosowany do ryb tetraploidalnych lub częściowo tetraploidalnych (jesiotrów),
- kompatybilny z MS Excel 2003 i nowszymi,
- przyjazny dla użytkownika i bezpłatny,
- obecnie można pobrać ze strony autora:

http://pracownicy.uwm.edu.pl/d.kaczmarczyk/main_page.htm

Moduł: Select the best breeding pair

Używa danych obejmujących: polimorfizm loci genetycznych zawarty w bazach profili genetycznych, szacowanie zmienności genetycznej potomstwa oparte na dziedziczeniu mendlowskim

Umożliwia wybór spośród wielu wariantów doboru osobników do rozrodu takich, które umożliwią uzyskanie największej zmienności genetycznej u potomstwa

Może być użyty w:

- oszacowaniu zmienności genetycznej potomstwa każdej potencjalnej pary tarłowej,
- doborze zestawu par tarłowych ryb w celu ochrony gatunkowej lub hodowli,
- unikaniu kojarzenia osobników, genetycznie podobnych do siebie,
- zmniejszeniu ryzyka krzyżowania osobników blisko spokrewnionych,
- oceny i porównania wartości każdej pary tarłowej w zachowaniu zmienności genetycznej (indeks „ v ”),

Jak to wykonać?

Zastosowanie baz profili genetycznych w doborze osobników do tarła grupowego

Problem - ogromna liczba wariantów składu grup samców i samic do przebadania

liczba samców w stadzie	23
liczba samic w stadzie	25
liczba samców w grupie	4
liczba samic w grupie	4

liczba kombinacji	
samce	8855
samica	12650

całkowita liczba wariantów 112015750

Gdyby analiza zmienności genetycznej potomstwa jednego wariantu kojarzeń trwała 2 minuty – przebadanie wszystkich zajęłoby prawie 426 lat

Moduł: Select individuals for group spawning programu Genassemblage 2.2

Plik wejściowy, zakres danych i metoda szacowania zmienności genetycznej potomstwa jak w poprzednim module

Umożliwia szybkie przebadanie i porównanie ogromnej liczby wariantów grupy tarlaków i wybór optymalnego składu

Istnieje możliwość wyboru głównego wyznacznika zmienności genetycznej oraz dodatkowego

Jak to wykonać?

D. Prezentacja programu Genassemblage 2.2 jako narzędzia w gospodarowaniu zasobami kriokonserwowanego nasienia chronionych populacji ryb.

Kriokonserwacja gamet ryb:

- stosowana w programach ochrony gatunkowej
- zabezpiecza zmienność genetyczną (różnorodność alleli) populacji
- może być użyta w zapobieganiu wyginięciu populacji
- pomocna w hodowli towarowej jesiotrów
- stosowana w ochronie gatunków ryb zagrożonych wyginięciem (jesiotrów) oraz cennych linii hodowlanych
- potrzebuje narzędzi do zarządzania zasobami genetycznymi



Rysunek: <https://en.wikipedia.org>

Zarządzanie zasobami zmienności genetycznej w banku gamet jest możliwe, gdy:

- 1) Znane są charakterystyki genetyczne (profile) dawców gamet
- 2) Dysponujemy narzędziem bioinformatycznym umożliwiającym:
 - a) Identyfikację różnic genetycznych między dawcami
 - b) unikanie stosowania próbek od ryb podobnych genetycznie (zmniejszenie ryzyka chowu wsobnego)
 - c) dobór grupy próbek, które umożliwiają uzyskanie jak największej zmienności genetycznej przy użyciu jak najmniejszej liczby próbek (ekonomia wykorzystania próbek)
 - d) zastosowanie różnorodności allelicznej jako kluczowego wskaźnika

Oprogramowanie Genassemblage 2.2 spełnia te wymagania

Przykład użycia programu

W banku gamet przechowywana jest grupa próbek nasienia pochodząca od 24 samców, profile genetyczne ryb są znane i obejmują 9 loci mikrosatelitarnych,

Celem jest:

- 1) zidentyfikowanie grupy próbek, które najbardziej różnią się genetycznie między sobą,
- 2) przeniesienie przy użyciu jak najmniejszej liczby próbek 100% różnorodności alleli zidentyfikowanej wśród profili genetycznych ryb do następnej generacji,

Jak to wykonać?

Podsumowanie

Bazy profili genetycznych w połączeniu z technikami bioinformatycznymi są uniwersalnym narzędziem współczesnej biologii konserwacyjnej,

Umożliwiają ocenę efektów prowadzonych prac ochronnych i restytucyjnych gatunków ryb zależnych od człowieka,

Mają zastosowanie w pracach mających na celu zachowanie zmienności genetycznej ryb rozradzanych w warunkach akwakultury,

Można je stosować jako narzędzie w optymalizacji zarządzania zasobem zmienności genetycznej zdeponowanej w bankach kriokonserwowanego nasienia,

Budowa, aktualizacja i zastosowanie baz profili genetycznych jest istotna w ochronie ryb łososiowatych, jesiotrów oraz innych gatunków zagrożonych wyginięciem.

Dziękuję za uwagę

