

Hanna Panagiotopoulou¹, Danijela Popović², Anna Stanković^{1,3,4}, Ryszard Kolman⁵,
Marek Raczkowski⁶, Mirosław Szczepkowski⁷

¹Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

²Centrum Nowych Technologii (CeNT), Uniwersytet Warszawski

³Instytut Genetyki i Biotechnologii, Uniwersytet Warszawski

⁴Ośrodek Badań nad Antykiem Europy Południowo-Wschodniej, Uniwersytet Warszawski

⁵Zakład Ichtiologii, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

⁶Ośrodek Hodowli Pstrąga Kuźniczka

⁷Zakład Hodowli Ryb Jesiotrowatych w Pieczarkach, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

Badania genetyczne biologicznego materiału wyjściowego do prac nad restytucją jesiotra bałtyckiego (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchill) w Polsce

Wstęp

Jesiotr bałtycki był jedynym dwuśrodowiskowym przedstawicielem rodzaju *Acipenser* występującym w basenie Morza Bałtyckiego. Dojrzałe osobniki na tarło wstępowały do rzek wschodniego i południowego Bałtyku, takich jak Nawa, Wołchow, Dźwina, Niemen, Pregota, Wiśła i Odra i wędrowały na tarliska położone w ich górnych nurtach lub w ich dopływach (Wałęcki 1864, Kulmatycki 1933, Berg 1948, Kuderskii 1983).

Rozwój transportu wodnego, zabudowa hydrotechniczna rzek, ich zanieczyszczenie oraz nadmierna eksploatacja rybacka to główne przyczyny spadku liczebności bałtyckiej populacji jesiotra ostronosego obserwowanego już w średniowieczu (Urbanowicz 1965, Kolman 2003). Szczególnie drastyczne nasilenie tego procesu nastąpiło w pierwszej połowie XX wieku, co doprowadziło do całkowitego wyginięcia bałtyckiej populacji jesiotra.

Poprawa jakości środowiska wodnego naszych rzek, a także zmiana statusu systematycznego jesiotra bałtyckiego umożliwiły podjęcie prac nad jego restytucją (Kolman i in. 2008). Jedynym, możliwym do pozyskania i wykorzystania materiałem wyjściowym, w świetle wyników badań zarówno morfometrycznych, jak i genetycznych, jest zapłodniona ikra lub wylęg uzyskany od dzikich tarlaków jesiotra ostronosego *Acipenser oxyrinchus*, pochodzących z północnych populacji i migrujących na tarło do rzek Św. Jana i Św. Wawrzyńca (Artiukhin i Vecsei 1999, Ludwig i in. 2002, Kolman 2003, Stankovic i in. 2007, Popovic i in. 2008).

Kierując się powyższymi przesłankami, w końcu sierpnia 2004 roku, sprowadzono do Polski z Kanady wylęg jesiotra ostronosego, a następnie narybek pochodzący

z rozrodu przeprowadzonego w 2002 roku. Począwszy od 2005 roku, corocznie do Polski przywożona jest zapłodniona ikra pochodząca ze sztucznego rozrodu tarlaków łowionych w rzece Św. Jana (fot. 1) (Kolman i in. 2005). Bezpośredni udział w połowach oraz w sztucznym rozrodzie umożliwił zebranie materiału biologicznego do badań genetycznych, których wyniki pozwoliły na scharakteryzowanie ich zróżnicowania genetycznego. Część wylęgu uzyskanego w efekcie podchowu w warunkach kontrolowanych, przeznaczona jest do dalszego chowu w celu stworzenia stad tarlaków. Dodatkowo stado selektów zostało wzbogacone o roczniki 1997 i 2001 przekazane w 2006 roku przez Instytut Ekologii Wód i Rybactwa w Berlinie w ramach podpisanej umowy o współpracy z Instytutem Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie. Od przedstawicieli wszystkich roczników pobierano materiał biologiczny do badań genetycznych, na podstawie którego scharakteryzowano polimorfizm genetyczny stada selektów. Wyniki tych badań, rozszerzone o badania indywidualne profili genetycznych umożliwią opracowanie schematu krzyżowań, tak by nie doszło do chowu wsobnego i aby utrzymany został możliwie wysoki poziom zmienności genetycznej. Celem niniejszej pracy była analiza genetyczna wylęgu jesiotra z rocznika 2011 i porównanie jej ze zmiennością genetyczną hodowanego w Polsce stada jesiotrów ostronosych oraz populacją założycielską z rzeki Św. Jana.

Materiały i metody

Materiał do badań

Materiał biologiczny do badań genetycznych pobierano od ryb w postaci skrawków płetw piersiowych.

Pobrane fragmenty tkanek były konserwowane w 75% roztworze alkoholu etylowego. W 2011 roku prowadzono badania genetyczne w oparciu o pięć dorosłych osobników (dwóch samic i trzech samców) jesiotra ostronosego, złowionych w rzece Św. Jana w Kanadzie, użytych do sztucznego tarła oraz 24 osobników narybku otrzymanego w wyniku tego tarła, podzielonego na dwie grupy (po 12 osobników). Podział narybku na dwie grupy (partie), wynika z przeprowadzenia dwóch niezależnych krzyżowań pomiędzy pozyskanymi tarłakami.

Izolacja i amplifikacja DNA

DNA ekstrahowano z fragmentów płetw za pomocą zestawu GenomicMini (A&A Biotechnology). Wyekstrahowany DNA zawieszano w 100 μ l wody. Jakość izolowanego DNA sprawdzono przeprowadzając elektroforezę w 1% żelu agarozowym. Stężenie DNA w próbkach określono spektrofotometrycznie (ND-1000 Nanodrop Technologies).

Amplifikacje fragmentów mikrosatelitarnego DNA (msDNA) przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu Qiagen Multiplex PCR. Reakcje amplifikacji wykonywano z wykorzystaniem 16 par starterów reakcji PCR, pogrupowanych w cztery zestawy – miksy (tab. 1). Reakcje multiplex PCR były przeprowadzane w objętości 10 μ l mieszaniny reakcyjnej z użyciem 1 μ l matrycy DNA. Stężenie starterów w reakcji PCR wynosiło 0,1 μ M (poza AoxD188 – 0,3 μ M, Ls68 – 0,4 μ M, AoxD241 – 0,05 μ M oraz AoxD297, AoxC27, AoxD64 i – 0,2 μ M). Reakcje prowadzono w następujących warunkach: wstępna denaturacja przez 15 min w 95°C, kolejno 35 cykli denaturacji w 94°C przez 30 s, przyłączania starterów w 63°C (miks 1 i 2) lub 61°C (miks 3 i 4) przez 90 s oraz wydłużanie matrycy w 72°C przez 30 s. Ostateczny czas wydłużania matrycy wyniósł 30 min w 60°C.

Zastosowane metody analiz statystycznych

Do analizy chromatogramów, identyfikujących długości fragmentów mikrosatelitarnego DNA zastosowano program PeakScanner Software v.1.0 (Applied Biosystem). Podziału na grupy rodzinne oraz analizy sukcesu reprodukcyjnego poszczególnych tarłaków dokonano przyporządkowując genotypy badanego narybku do profili genetycznych tarłaków. Otrzymane wyniki zweryfikowano, obliczając dystans genetyczny pomiędzy parami osobników narybku w programie GenAlEx v.6.1 (Peakall i Smouse 2006), który zobrazowano za pomocą analizy głównych koordynat (PCoA) oraz dokonując podziału na grupy pokrewieństwa – rodzeństwa (FSR, metoda Descending Ratio) w programie Kingroup v.2.090501 (Konovalov i Heg 2008). Wskaźniki pokrewieństwa (R_{xy}) pomiędzy parami tarłaków jesiotra ostronosego obliczono metodą Queller i Goodnighta (1989) w programie Kingroup v.2.090501. Analizy wskaźników R_{xy} wykonano w oparciu o frekwencje alleli

dotychczas zbadanej naturalnej populacji jesiotrów z rzeki Św. Jana.

Przeprowadzono porównawczą analizę polimorfizmu 16 loci msDNA dla narybku uzyskanego w 2011 z narybkiem uzyskanym w poprzednich latach (1997-2009) (analizy objęły przede wszystkim osobniki oznakowane, wchodzące w skład tworzonego stada zarodowego). W powyższej analizie obliczono następujące wskaźniki polimorfizmu: N_a – liczbę alleli w locus, N_e – efektywną liczbę alleli w locus, N_p – liczbę alleli prywatnych, H_o – heterozygotyczność obserwowaną oraz H_e – heterozygotyczność oczekiwaną. Następnie obliczono dystans genetyczny (F_{ST}), który zobrazowano za pomocą analizy głównych koordynat (PCoA). Analizy te wykonano w programie GenAlEx v.6.1. Poglądową analizę genetycznego przyporządkowania osobników jesiotra ostronosego do poszczególnych grup roczników narybku i tarłaków z populacji Św. Jana przeprowadzono w oparciu o analizę frekwencji alleli (Paetkau i in. 2004) w programie GenAlEx v.6.1.

TABELA 1

Zestawy (miksy) multipleksowe do amplifikacji 16 loci msDNA. Każdy ze starterów forward (For) został wyznakowany jednym z trzech barwników fluorescencyjnych: TAMRA- żółty, FAM- niebieski, HEX- zielony

No.	Miks	Nazwa	Nr dostępu GenBank	No.	Miks	Nazwa	Nr dostępu GenBank
1	1	AoxC45	AY093632	1	3	AoxD64	AY093637
2		AoxD54	AY093636	2		AoxD242	AY093647
3		AoxD161	AY093639	3		AoxC27	AY093629
4		AoxD297	AY093648	4		AoxC55	AY093633
5	2	Aox45	AF067813	5	4	AoxC30	AY093631
6		AoxD170	AY093641	6		AoxD241	AY093646
7		AoxD188	AY093644	7		Ls68	U72739
8		AoxD234	AY093645	8		AoxD186	AY093643

Wyniki

Otrzymano profile mikrosatelitarne oraz wykonano analizy polimorfizmu dla pięciu tarłaków jesiotra ostronosego, uczestniczących w sztucznym rozrodzie w 2011 i dwóch grup narybku z rocznika 2011 (24 osobniki), z użyciem 16 loci msDNA. Izolowane DNA było dobrej jakości (średnie stężenie 700 ng/ μ l), umożliwiając uzyskanie kompletnych genotypów w prawie wszystkich przypadkach (tab. 2). Sukces reprodukcyjny odniósł trzy z pięciu analizowanych tarłaków oraz dwa dodatkowe tarłaki, oznaczone jako 2011_XM i 2011_XF, dla których nie otrzymano materiału do analiz. Na podstawie uzyskanych profili genetycznych narybku oraz pozostałych tarłaków, odtworzono brakujące genotypy dla tych osobników (tab. 2), z wyjątkiem sześciu alleli, w których przypadku można było jedynie domniemywać, że badane loci są homozygotyczne. Analizy tej dokonano w oparciu o prawo dziedziczenia, w której stwierdzone u potomstwa, a nie zidentyfikowane wśród zbadanej puli tarłaków allele, zostały przypisane do profili

genetycznych osobników rodzicielskich 2011_XM i 2011_XF.

Na podstawie porównania genotypów tarlaków z profilami genetycznymi narybku stwierdzono, że grupy narybku oznaczone jako 1 i 2 pochodzą z tarła dwóch różnych samic. Grupa narybku nr 1 składa się z potomstwa samicy 2011_XF i trzech samców (2011_XM, 2011_M1 i 2011_M2). Stwierdzono, że w przypadku dziewięciu osobników narybku tej grupy (75%) obserwowano allele charakterystyczne dla genotypu samca oznaczonego symbolem 2011_XM. Pozostały udział samców: 2011_M1 i 2011_M2 wyniósł odpowiednio: 17% i 8%. Grupa narybku nr 2 składała się z potomstwa samicy 2011_F2 i dwóch samców (2011_XM oraz 2011_M1). W tym przypadku dominujący udział w reprodukcji miał również samiec 2011_XM (75%).

Analiza dystansu genetycznego wykonana w programie GenAIEx v.6.1 oraz podział na grupy pokrewieństwa

metodą FSR w programie Kingroup v.2.090501 wyróżniły 5 grup rodzeństwa, z których analiza osobniczego dystansu genetycznego była w pełni zgodna z analizą przyporządkowania genotypów narybku do profili genetycznych tarlaków (rys. 1). Stosując metodę FSR stwierdzono nieznaczne rozbieżności w podziale na grupy rodzeństwa w przypadku osobników 11, 3 i 2 z grupy narybku nr1, w której to osobniki 2011_1_11 oraz 2011_1_2 uznane zostały błędnie za rodzeństwo pełnej krwi, choć są rodzeństwem przyrodnim (patrz tab. 2). Analiza ta wyodrębniła jednak zasadniczo takie same grupy krewniacze, co pozostałe metody, dlatego może być z powodzeniem stosowana w analizach bardzo liczebnych grup lub w sytuacjach, w których brak jest informacji o genotypach rodzicielskich.

Przeprowadzone analizy pokrewieństwa krzyżowanych tarlaków należy traktować jako wynik przybliżony, gdyż bazują one na aktualnej (zbadanej dotychczas) fre-

TABELA 2

Profile genetyczne badanych osobników użytych do tarła oraz narybku jesiotra ostronoszego z rocznika 2011 dla 16 loci msDNA. Allele zakodowano w postaci numerycznej. Podziału na grupy rodzinne dokonano, przyporządkowując genotypy badanego narybku do profili genetycznych tarlaków. Unikalne dla tarlaków allele w danym locus, umożliwiające pewne przypisanie narybku właściwym osobnikom rodzicielskim, oznaczono odpowiednio kolorami

osobnik/locus	AoxC45	AoxD170	AoxD234	Aox45	AoxD54	AoxD188	AoxD161	AoxD297									
Tarlaki																	
2011_F2	1	1	1	3	5	5	2	2	3	4	1	1	1	3	1	5	
2011_M1	1	1	2	5	2	3	2	4	3	3	1	3	1	2	3	4	
2011_M2	1	1	2	2	6	7	4	5	1	3	3	4	1	1	2	4	
2011_XM	1	1	1	4	1	8	1	2	2	3	1	2	3	3	1	4	
2011_XF	1	1	2	5	4	1	3	2	2	3	3	1	1	3	4	6	
Potomstwo pary tarłowej 2011_XF * 2011_XM																	
2011_1_1	1	1	1	4	5	4	8	2	3	2	2	1	2	1	3	4	4
2011_1_10	1	1	1	5	1	8	2	2	3	3	1	1	1	1	3	1	4
2011_1_12	1	1	1	2	1	4	1	2	2	3	1	3	3	3	4	4	
2011_1_4	1	1	2	4	1	4	2	3	2	3	2	3	1	3	4	6	
2011_1_5	1	1	4	5	1	4	2	2	3	3	1	2	1	3	4	4	
2011_1_6	1	1	1	0	1	4	2	3	3	3	1	3	1	3	1	4	
2011_1_7	1	1	1	5	4	8	1	3	3	3	1	1	1	3	1	6	
2011_1_8	1	1	2	4	1	8	2	3	2	3	2	3	3	3	4	6	
2011_1_9	1	1	1	0	4	8	2	3	3	3	1	3	3	3	4	4	
Potomstwo pary tarłowej 2011_XF * 2011_M1																	
2011_1_11	1	1	2	5	2	4	2	2	4	3	3	1	1	1	3	4	4
2011_1_3	1	1	2	2	1	2	2	2	2	3	1	3	1	3	3	6	
Potomstwo pary tarłowej 2011_XF * 2011_M2																	
2011_1_2	1	1	2	2	4	7	3	5	2	3	3	3	1	3	4	4	
Potomstwo pary tarłowej 2011_F2 * 2011_XM																	
2011_2_24	1	1	1	4	1	5	2	2	2	3	1	2	3	3	1	4	
2011_2_22	1	1	1	1	1	5	1	2	3	4	1	2	1	3	1	0	
2011_2_13	1	1	3	4	5	8	2	2	2	4	1	2	3	3	5	1	
2011_2_14	1	1	1	4	5	8	1	2	3	3	1	2	1	3	1	1	
2011_2_15	1	1	1	4	5	8	1	2	3	4	1	2	3	3	4	1	
2011_2_16	1	1	3	4	5	8	1	2	2	3	1	2	1	3	1	1	
2011_2_17	1	1	1	4	5	8	1	2	2	4	1	2	1	3	4	5	
2011_2_20	1	1	1	1	5	8	2	2	2	4	1	1	1	3	1	1	
2011_2_23	1	1	1	0	5	8	2	2	2	3	1	1	1	3	4	5	
Potomstwo pary tarłowej 2011_F2 * 2011_M1																	
2011_2_18	1	1	1	5	3	5	2	4	3	3	1	3	1	2	1	4	
2011_2_19	1	1	2	3	3	5	2	2	3	4	1	1	1	2	1	3	
2011_2_21	1	1	1	2	3	5	2	4	3	3	1	1	1	1	4	1	

osobnik/locus	LS68	AoxD241	AoxC55	AoxC27	AoxD64	AoxD186	AoxD242	AoxC30									
Tarlaki																	
2011_F2	2	3	4	5	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	
2011_M1	1	3	1	5	1	1	1	1	1	6	1	4	1	2	1	1	
2011_M2	5	5	2	5	1	1	1	2	1	4	2	5	1	2	1	2	
2011_XM	4	6	6	7	1	1	1	1	1	1	2	4	1	3	1	2	
2011_XF	3	4	3	4	1	1	1	1	1	2	5	3	5	2	4	1	1
Potomstwo pary tarłowej 2011_XF * 2011_XM																	
2011_1_1	4	6	4	7	1	1	1	1	1	5	4	5	3	4	1	2	
2011_1_10	4	4	3	6	1	1	1	1	1	5	3	2	3	4	1	2	
2011_1_12	4	4	3	7	1	1	1	1	1	5	4	5	1	2	1	1	
2011_1_4	4	4	4	7	1	1	1	1	1	2	3	4	1	4	1	1	
2011_1_5	4	4	3	7	1	1	1	1	1	2	2	5	2	3	1	1	
2011_1_6	3	4	4	7	1	1	1	1	1	0	3	4	1	2	1	1	
2011_1_7	3	6	3	6	1	1	1	1	1	2	4	5	1	2	1	1	
2011_1_8	3	6	3	6	1	1	1	1	1	2	4	5	3	4	1	1	
2011_1_9	3	0	4	0	1	1	1	1	1	5	3	4	1	0	1	1	
Potomstwo pary tarłowej 2011_XF * 2011_M1																	
2011_1_11	3	4	4	5	1	1	1	1	1	5	6	1	5	0	4	1	1
2011_1_3	1	4	3	5	1	1	1	1	1	2	6	3	1	1	4	1	1
Potomstwo pary tarłowej 2011_XF * 2011_M2																	
2011_1_2	3	5	4	5	1	1	1	1	1	5	2	5	2	2	1	2	
Potomstwo pary tarłowej 2011_F2 * 2011_XM																	
2011_2_24	3	4	5	7	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	
2011_2_22	2	4	4	7	1	1	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	
2011_2_13	2	6	4	7	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	
2011_2_14	2	4	4	6	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	
2011_2_15	2	4	4	7	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3	1	1	
2011_2_16	2	4	4	6	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	
2011_2_17	2	6	4	6	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	2	
2011_2_20	3	4	5	7	1	1	1	1	1	1	1	4	1	3	1	1	
2011_2_23	2	6	4	6	1	1	1	1	1	3	1	2	1	3	1	2	
Potomstwo pary tarłowej 2011_F2 * 2011_M1																	
2011_2_18	3	3	1	5	1	1	1	1	1	6	1	1	1	1	1	1	
2011_2_19	1	3	5	5	1	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	
2011_2_21	1	3	1	5	1	1	1	1	1	3	6	1	4	1	1	1	

kwencji alleli w populacji jesiotrów z rzeki Św. Jana i mogą ulegać nieznacznym zmianom w zależności od puli zbadanych osobników (tab. 3):

Pokrewieństwo (wskaźnik R_{xy}) krzyżowanych osobników w grupie narybku nr 1:

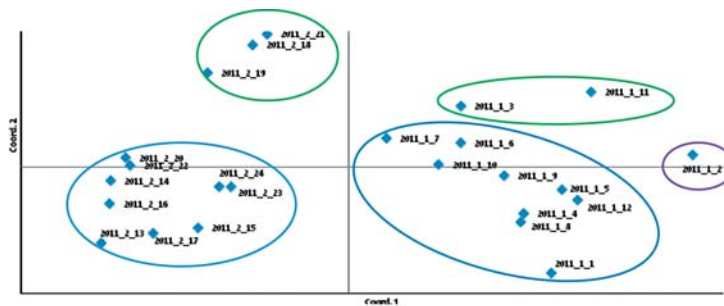
- 2011_XF * 2011_XM (75%) – pokrewieństwo nieznaczące, rzędu kuzynów trzeciego stopnia ($R_{xy} = 0,07$).
- 2011_XF * 2011_M1 (17%) – pokrewieństwo dość wysokie, rzędu kuzynów drugiego stopnia ($R_{xy} = 0,18$).
- 2011_XF * 2011_M2 (8%) – osobniki niepokrewnione, różne genetycznie ($R_{xy} = -0,08$).

Pokrewieństwo krzyżowanych osobników w grupie narybku nr 2:

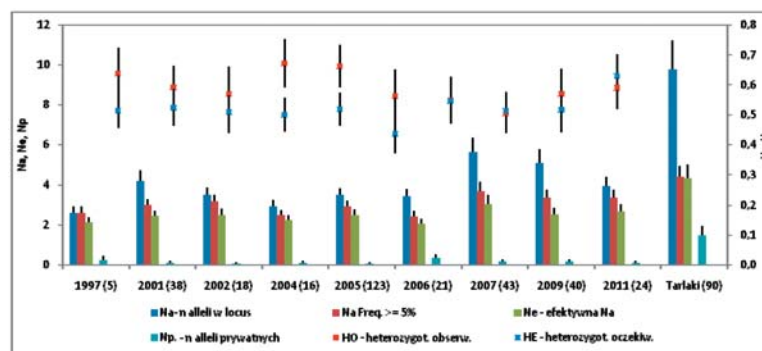
- 2011_F2 * 2011_XM (75%) – pokrewieństwo dość wysokie, rzędu kuzynów drugiego stopnia ($R_{xy} = 0,16$).
- 2011_F2 * 2011_M1 (25%) – pokrewieństwo wysokie, pomiędzy rzędem kuzynów pierwszego a drugiego stopnia ($R_{xy} = 0,21$).

Porównanie polimorfizmu genetycznego tarlaków i narybku z roczników 1997-2011 wykazało, że zmienność genetyczna narybku z rocznika 2011 zbliżona jest do zmienności obserwowanej u narybku w latach poprzednich (rys. 2). Zmienność ta jest jednak dużo niższa w porównaniu z grupą tarlaków odłowionych w rzece Św. Jana, gdyż jest wynikiem krzyżowania kilku osobników z tej populacji.

Obliczony dystans genetyczny (F_{ST}), wykazał, że narybek z rocznika 2011 jest najbardziej zbliżony do rocznika 2002, a najbardziej odmienny od rocznika 1997. W stosunku do grupy tarlaków z lat 2005-2011 (90 osobników), badany narybek charakteryzuje mały dystans genetyczny (tab. 4, rys. 3). Podobnie analiza przyporządkowania osob-



Rys. 1. Relacje pokrewieństwa w obrębie narybku z rocznika 2011 przedstawione w postaci analizy głównych koordynat (PCoA) osobniczego dystansu genetycznego. Osobniki oznaczone nr 1 lub 2 to odpowiednio potomstwo samic: 2011_XF oraz 2011_F2. Zbiory reprezentują rodzeństwo pełnej krwi (wspólnej matki i ojca) pochodzące od samców 2011_XM (niebieski), 2011_M1 (zielony) oraz 2011_M2 (fioletowy). Przedstawiona analiza PCoA dystansu genetycznego obrazuje 56% rzeczywistego zróżnicowania między osobnikami.



Rys. 2. Porównanie zmienności genetycznej roczników narybku z lat 1997-2011 oraz tarlaków z rzeki Św. Jana w Kanadzie z wykorzystaniem podstawowych wskaźników polimorfizmu genetycznego (słupki błędów reprezentują wartości błędów standardowych).

ników (rys. 4) wykazała, że narybek z rocznika 2011 łączy się wraz z tarlakami z rzeki Św. Jana w jednorodną grupę.

Podsumowanie

Przeprowadzone analizy wykazały, że narybek z rocznika 2011 jest wynikiem dwóch niezależnych krzyżówek jednej samicy (2011_XF) z trzema (grupa 1) oraz jednej samicy (2011_F2) z dwoma samcami (grupa 2), w których ten sam samiec (2011_XM) miał dominujący udział (75%). W czterech przypadkach stwierdzono, że krzyżowane tar-

TABELA 3

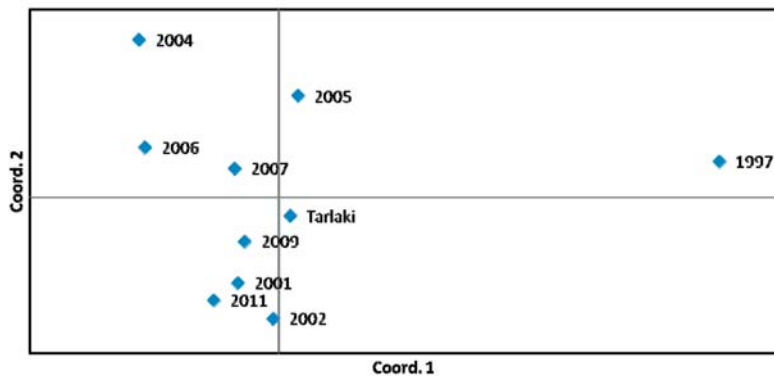
Wskaźniki pokrewieństwa (R_{xy}) pomiędzy parami osobników jesiotra ostronosego wykorzystanych do sztucznego tarła latem 2011 roku (Kingroup v.2.090501). Osobniki oznaczone kolorem czerwonym reprezentują tarlaki o zrekonstruowanych genotypach. Wartości pokrewieństwa dla udanych krzyżówek, odpowiednio w grupie narybku nr 1 oraz 2 wytłuszczone

R_{xy}	2011_F1	2011_F2	2011_M1	2011_M2	2011_M3	2011_XM
2011_F2	0,2101					
2011_M1	0,1644	0,2140				
2011_M2	0,0071	-0,2473	0,0679			
2011_M3	-0,2956	0,0075	0,3066	0,0043		
2011_XM	-0,1623	0,1586	0,0031	-0,1751	0,0445	
2011_XF	-0,1792	0,0282	0,1825	-0,0823	0,1573	0,0694

TABELA 4

Wartości zróżnicowania genetycznego (F_{ST}) pomiędzy poszczególnymi rocznikami narybku oraz tarlakami jesiotra ostronosego z rzeki Św. Jana

F_{ST}	1997	2001	2002	2004	2005	2006	2007	2009	2011
2001	0,17								
2002	0,16	0,08							
2004	0,20	0,13	0,14						
2005	0,15	0,11	0,13	0,10					
2006	0,19	0,12	0,11	0,12	0,12				
2007	0,14	0,08	0,09	0,10	0,08	0,06			
2009	0,15	0,07	0,08	0,14	0,09	0,08	0,05		
2011	0,18	0,09	0,08	0,13	0,12	0,14	0,09	0,09	
Tarlaki	0,10	0,05	0,06	0,09	0,06	0,06	0,02	0,03	0,05



Rys. 3. Dystans genetyczny F_{ST} zobrazowany za pomocą analizy głównych koordynat (PCoA). Przedstawiona analiza PCoA dystansu genetycznego F_{ST} obrazuje 50% rzeczywistego zróżnicowania grup narybku i tarlaków.

laki są ze sobą spokrewnione, o czym świadczą dodatnie wartości wskaźnika pokrewieństwa R_{xy} . Warto zaznaczyć, że w jednym przypadku (pary tarłowej 2011_F2 * 2011_M1) było to wysokie pokrewieństwo ($R_{xy} = 0,21$), które może skutkować negatywnymi efektami wsobności w postaci ujawnienia się recesywnych chorób genetycznych, gorszej żywotności oraz dostosowania u tej partii narybku. Szczęśliwie, udział procentowy tego samca w rozrodzie nie był wysoki. Najkorzystniejszymi krzyżówkami były pary tarłowe 2011_XF * 2011_XM oraz 2011_XF * 2011_M2, dla których stwierdzono znikome pokrewieństwo lub jego brak.

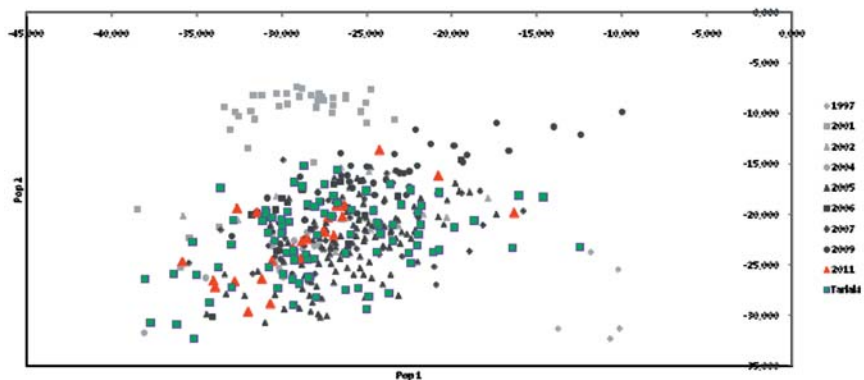
Narybek z rocznika 2011, cechuje się porównywalnym polimorfizmem genetycznym do dotychczas analizowanych grup narybku z lat 1997-2009. Analizowana grupa narybku jest bardzo podobna genetycznie do zbadanej dotychczas puli tarlaków pochodzącej z rzeki Św. Jana, co wskazuje na fakt, iż wykorzystane do rozrodu tarlaki w roku 2011 stanowią reprezentatywną pulę genową tej populacji. Na potrzeby utworzenia przyszłego stada zarodowego z osobników należących do badanego rocznika, optymalne byłoby wytypowanie grup osobników (o takiej samej liczebności), pochodzących od każdej pary tarłowej. Dzięki temu, zachowana zostanie zmienność genetyczna przy jednoczesnym zniesieniu efektu dominacji poszczególnych samców w sukcesie reprodukcyjnym. W zależności od kondycji narybku, pochodzącego od pary blisko spokrewnionych rodziców, jego ilościowy udział w tworzonej stadzie tarłowym pozostaje do rozważenia.

W przyszłości krzyżowania w obrębie grupy ryb z rocznika 2011 powinny zostać poprzedzone badaniami genetycznymi znakowanych osobników i zaplanowane, gdyż znaczna większość osobników jesiotra ostronosego stanowi przyrodnie rodzeństwo bądź ze strony matki (2011_F2 lub 2011_XF) bądź ojca (2011_XM lub 2011_M1).

Podziękowania i finansowanie

Autorzy dziękują Jörnowi Gessnerowi za materiał badawczy jesiotra ostronosego z roczników 2005, 2007 oraz tarlaków z rzeki Św. Jana z roku 2008. Przedstawione w pracy wyniki uzyskano w trakcie realizacji badań w ramach następujących projektów:

- Projektu PO Ryby 2007-2013 nr OR1400003/10/11, pt. „Projekt pilotażowy w zakresie doskonalenia metod chowu i hodowli jesiotra ostronosego i pilotażowych zarybień”.
- Projektu nr ZPB/62/72 380/IT2/10 NCBiR



Rys. 4. Analiza przyporządkowania genetycznego osobników jesiotra ostronosego, należących do poszczególnych roczników narybku oraz populacji źródłowej St. John w Kanadzie.

(UW CENT) INITECH „Analiza genetyczna ważnych gospodarczo gatunków ryb w związku z odbudową ich populacji w wodach Polski”.

- Projektu nr 12-0129-10/2010 NCBiR (SGGW) „Nowoczesne technologie w hodowli jesiotra” z wykorzystaniem urządzeń analitycznych CePT, współfinansowanych ze środków Unii Europejskiej.

Literatura

- Artiukhin E., Vecsei P. 1999 – On the status of Atlantic sturgeon: conspecificity of European *Acipenser sturio* and North American *Acipenser oxyrinchus* – J. Appl. Ichthyol. 15: 35-37.
- Berg L.S. 1948 – Ryby presnykh vod SSSR i soprodelnykh stran – Cz. 1 – Wyd. AN SSSR, Moskwa: 467.
- Kolman R. 2003 – Jaki jesiotr wyginął w Bałtyku? – Komun. Ryb. 1: 1-3.
- Kolman R., Ceapa C., Przeździecki M. 2005 – Tarło jesiotra ostronosego, *Acipenser oxyrinchus* Mitch., nad rzeką Św. Jana – Komun. Ryb. 3: 13-15.
- Kolman R., Kapusta A., Szczepkowski M., Duda A., Bogacka-Kapusta E. 2008 – Jesiotr bałtycki *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchell – Wyd. IRS, Olsztyn: 73.
- Konovalov D.A., Manning C., Henshaw M.T. 2004 – KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers – Mol. Ecol. Notes 4: 779-782.
- Kuderskij L.A. 1983 – Osetrovye ryby v bassejnach onezhskogo i ladozhskogo ozer. Ryby onezhskogo ozero i ikh khozjajstvennoe ispol'zovanie – Sborn. Nauch. Trud. GosNIORKh: 128-148.
- Kulmatycki W. 1933 – W sprawie zachowania jesiotra w rzekach Polskich – Ochrona Przyrody. Roczn. 12: 1-21.

- Ludwig A., Debus L., Lieckfeld D., Wirigin I., Benecke N., Jenneckens I., Wil-
lot P., Waldman J.R., Pitra C. 2002 – When the American sea stur-
geon swam east – *Nature* 493: 447-448.
- Paetkau D., Slade R., Burdens M., Estoup A. 2004 – Genetic assignment
methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simu-
lation based exploration of accuracy and power – *Mol. Ecol.* 13:
55-65.
- Peakall R., Smouse P.E. 2006 – GENALEX 6: genetic analysis in Excel.
Population genetic software for teaching and research – *Mol. Ecol.*
Notes 6: 288-295.
- Popovic D., Panagiotopoulou H., Gruchota J., Makowiecki D., Węgleński P.,
Stankovic A. 2008 – Program restytucji jesiotra w Polsce w oparciu
o analizy antycznego DNA – W: Aktualny stan i aktywna ochrona natu-
ralnych populacji ryb jesiotrowatych zagrożonych wyginieciem, Wyd.
IRS, Olsztyn: 203-210.
- Queller D.C., Goodnight K.F. 1989 – Estimating relatedness using genetic
markers – *Evolution* 43: 258-275.
- Stankovič A., Panagiotopoulou H., Węgleński P., Popovič D. 2007 – Badania
genetyczne nad jesiotrem w związku z programem jego restytucji
w wodach Polski – W: Restytucja jesiotra bałtyckiego, Wyd. IRS,
Olsztyn: 21-26.
- Urbanowicz K. 1965 – Potowy jesiotra zachodniego *Acipenser sturio* L. we
wczesnym Gdańsku w świetle materiałów wykopaliskowych –
Przegląd Zoologiczny IX, 4: 372-377.
- Wałęcki A. 1864 – Systematyczny przegląd ryb krajowych – Wyd. Drukarnia
Gazety Polskiej, Warszawa: 93-94.

Przyjęto po recenzji 30.11.2012 r.

GENETIC STUDIES OF THE INITIAL BIOLOGICAL MATERIAL USED IN WORK TO RESTORE THE BALTIC STURGEON (*ACIPENSER OXYRINCHUS OXYRINCHUS* MITCHILL) IN POLAND

Hanna Panagiotopoulou, Danijela Popović, Anna Stanković, Ryszard Kolman, Marek Raczkowski,
Mirostaw Szczepkowski

ABSTRACT. Work to restore the Baltic sturgeon was begun in Poland in 2004. The initial material has comprised mainly fertilized Atlantic sturgeon eggs imported annually from Canada. The aim of the current study was to use to perform genetic analyses based on 16 microsatellite loci of Atlantic sturgeon wild spawners used in artificial reproduction and breeding in 2011. These results were compared to those of previous analyses of individual Atlantic sturgeon bred for the restoration of this species in Poland and to individuals from the founder population from the Saint John River.

The analysis of polymorphism indicated that the genetic variation of the 2011 fry was similar to that observed in previous years. It was confirmed that groups of 2011 fry, designated as 1 and 2, originated from two different females. The group 1 fry were the progeny of one female and three males, while those in group 2 were the progeny of one female and two males. The reproductive success of the males was not equal, and in both instances the same male dominated. Some of the individuals used in breeding were related, which can produce negative inbreeding impacts in the progeny of these pairs. In the interests of building a future broodstock from the year class analyzed in this study, it would be optimal to identify individuals that originate from each pairing in equal numbers.

Keywords: Atlantic sturgeon, microsatellite loci, genetic polymorphism, Baltic sturgeon restoration