

Selekcja karpia z wykorzystaniem markerów genetycznych w celu utworzenia syntetycznej linii karpia o podwyższonej odporności antywirusowej

Łukasz Napora – Rutkowski, Ilgiz Irnazarow

Polska Akademia Nauk, Zakład Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej w Gołyszach

1. Wprowadzenie

Karp (*Cyprinus carpio* L.) jest głównym gatunkiem hodowlanym ryb w Polsce. Karpie hoduje się w środowisku otwartym (głównie stawy), w którym to ryby narażone są na kontakt z licznymi patogenami. Niestety w wyniku zakażenia wirusami lub bakteriami bardzo często dochodzi do rozwoju chorób, które w hodowlach stawowych zwykle mają gwałtowny przebieg, dotyczą większości populacji i powodują duże straty. Przykładem jest tutaj zakażenie wirusem CyHV-3, które w ostatnich 20 latach bardzo szybko rozprzestrzeniło się na świecie, w tym także w Polsce, i jest odpowiedzialne za masowe śnięcia karpia oraz olbrzymie straty ekonomiczne hodowców.

Wirus CyHV-3 (cyprinid herpesvirus 3), znany także jako koi herpeswirus (KHV) (rodzaj: *Cyprinivirus*, rodzina: *Alloherpesviridae*, rząd: *Herpesvirales*) jest czynnikiem etiologicznym śmiertelnej choroby karpia. Choroba ta rozwija się szybko, jest bardzo zakaźna i może powodować straty dochodzące do 80-90% hodowli (Rakus i wsp., 2012). Specyfika hodowli karpia powoduje że bardzo trudno odpowiednio wcześniej można zareagować na rozwój zakażenia wirusem CyHV-3 a hodowcy praktycznie są pozbawieni możliwości powstrzymania rozprzestrzeniającej się choroby.

Jedną z metod zmierzających do ograniczenia strat spowodowanych wirusem CyHV-3 jest produkcja bardziej odpornego materiału obsadowego. Jest to możliwe dzięki odpowiednio prowadzonej selekcji umożliwiającej wykorzystanie potencjału genetycznego tkwiącego w populacjach hodowlanych karpia. Istnieje szereg danych wskazujących na możliwość występowania u ryb genetycznie uwarunkowanych różnic w odporności na choroby (Gjedrem i wsp. 1991, Fjalestad i wsp., 1993, Midtlyng i wsp., 2002, Das Mahapatra i wsp., 2008). Powszechnie wiadomo, iż w każdej populacji możemy wyróżnić zarówno osobniki bardziej odporne jak i bardziej podatne na zakażenia różnymi patogenami. Dodatkowo różne populacje danego gatunku różnią się między sobą odpornością na choroby. Zadaniem osób odpowiedzialnych za produkcję materiału obsadowego powinna być zatem odpowiednio prowadzona selekcja genetyczna zmierzająca do wyboru i rozrodu

takich osobników rodzicielskich bądź linii hodowlanych, których potomstwo wykazywałoby najwyższą odporność.

Obecnie selekcję prowadzi się z wykorzystaniem markerów genetycznych związanych z wyższą odpornością organizmu na wybrane patogeny. Dodatkowo poznanie mechanizmów odpornościowych ryb umożliwi odpowiedni dobór rodziców do utworzenia linii o podwyższonej odporności na zakażenia danym patogenem. **Selekcja z wykorzystaniem markerów genetycznych prowadzona w oparciu o wiedzę na temat mechanizmów odporności ryb na zakażenie danym patogenem jest innowacyjną i kompleksową metodą zmierzającą do otrzymania bardziej odpornej populacji karpia a co za tym idzie ograniczenia strat spowodowanych infekcją CyHV-3.**

2. Przesłanki do podjęcia prac

Zakład Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej PAN w Gołyszu posiada unikatową na skalę Europy kolekcję linii hodowlanych karpia. Są to linie polskie oraz sprowadzone w ciągu ostatnich 50 lat z Węgier, Ukrainy, Litwy, Francji, Jugosławii, Niemiec i Izraela (Dor 70) oraz japońskie karpie kolorowe koi. W Zakładzie prowadzone są prace nad genetycznymi uwarunkowaniami odporności karpia na zakażenia wybranymi patogenami (wiciowcem *Trypanoplasma borreli*, bakterią *Aeromonas hydrophila* oraz wirusem CyHV-3). W wyniku tych prac wykazano uwarunkowane genetycznie różnice w odporności badanych linii karpia na czynniki zakaźne (Jurecka i wsp., 2009; MacCarthy i wsp., 2008; Rakus i wsp., 2009 i 2012). Daje to podstawy do przyjęcia założeń, że wykorzystując genetyczne zróżnicowanie, można wyodrębnić także genotypy ryb o podwyższonej odporności na CyHV-3.

W przeprowadzonych dotychczas testach odporności na zakażenie wirusem CyHV-3 dla linii karpia hodowanych w ZIGR PAN w Gołyszu uzyskano istotne różnice w przeżywalności. Jednak nawet w najbardziej odpornej grupie karpia, nie stwierdzono przeżywalności przekraczającej 60% (Rakus i wsp., 2009). Wśród karpia istnieją jednak populacje, charakteryzujące się wysoką odpornością na zakażenie CyHV-3. Przykładem takim jest sazan amurski (*C. haematopterus* lub *C. rubrofuscus*) u którego wykazano wysoką (ponad 90% przeżywalność) odporność na wirusa CyHV-3 (Piackova i wsp., 2013).

W związku z powyższym w ZIGR PAN w Gołyszu podjęto działania w celu wykorzystania potencjału genetycznego sazana amurskiego poprzez ukierunkowany program krzyżowań z wybranymi liniami karpia hodowanymi w Zakładzie. Przy czym uwzględniono fakt, że sazan amurski posiada ułuszczenie typu pełnołuskiego (SSnn). Karpie pełnołuskie nie są chętnie widziane na rynku konsumenckim w Polsce. Dlatego też założono, że koniecznym

celem prac selekcyjnych będzie otrzymanie ryb cechujących się odpornością odziedziczoną po sazanie amurskim oraz jednocześnie będących karpami w typie lustrzeń nieregularny (ssnn). Pozostałe typy lustrzeni - typu lampasowego (SSNn, SsNn) lub gołego (ssNn) nie będą hodowane ze względu na niekorzystny wpływ allelu N nawet w stanie heterozygotycznym.

3. Wykonane prace wstępne oraz eksperymenty pilotowe.

W celu uzyskania nowej linii karpia odpornej na zakażenia wirusem CyHV-3, otrzymano pokolenie F1 poprzez skrzyżowanie polskiej linii ochabskiej (3) z sazanem amurskim (SA) oraz polskiej linii knyszyńskiej (K) z sazanem amurskim (SA). Ostatecznie, po serii testów wybrano krzyżówkę 3xSA, ze względu na lepsze wyniki produkcyjne. Linia ochabska (3) została założona w 1954 roku i powstała w wyniku długofalowej selekcji na tempo wzrostu osobników. Karpie tej linii charakteryzują się ułuszczeniem typu lustrzeń (ssnn) ich zalety ujawniają się gdy są używane w tworzeniu krzyżówek towarowych, które charakteryzują się silnym efektem heterozji pod względem tempa wzrostu i przeżywalności (Białowąs i wsp., 2008). Pełnołuski sazan amurski (SA) został sprowadzony z University of South Bohemia, Faculty of Fisheries and Protection of Water, Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology, Vodnany, Republika Czeska.

W wyniku skrzyżowania tarlaków obu tych linii otrzymano pokolenie F1 karpie pełnołuskich, charakteryzujące się wysoką odpornością na CyHV-3, co zostało potwierdzone w eksperymentalnych zakażeniach tym wirusem oraz wysoką przeżywalnością na stawach (dane przygotowywane do publikacji).

Następnie, przeprowadzono tarło wsobne ryb z pokolenia F1. Otrzymano w ten sposób pokolenie różnicujące F2, gdzie 25% narybku posiadało ułuszczenie typu lustrzeń nieregularny (ssnn) zaś 75% to karpie pełnołuskie. Ryby te, zarówno pełnołuskie jak i lustrzenie, charakteryzowały się bardzo wysoką odpornością na wirusa CyHV-3 (przeżywalność do 90 %), co zostało wykazane w dwóch niezależnych eksperymentalnych zakażeniach, przeprowadzonych w PIWet w Puławach. Godnym uwagi w kontekście planowanych prac jest fakt, że nie stwierdzono żadnej korelacji między typem ułuszczenia (pełnołuski vs lustrzeń) a odpornością na CyHV-3 w potomstwie F2 (dane przygotowywane do publikacji).

Wśród karpia lustrzeni F2 wybrano ryby o najlepszych parametrach pokroju i przeznaczono je na tarlaki. Ryby te są hodowane w pomieszczeniu wyposażonym w zbiorniki o recyrkulowanym obiegu wody. Ryby te oraz obiegi na których są hodowane są wolne od wirusa CyHV-3, co potwierdzają rutynowo wykonywane testy.

Przeprowadzone doświadczenia pilotowe pozwalają wyciągnąć dwa istotne wnioski:

1. Karpie typu lustrzeń w pokoleniu F2, powstałe w wyniku krzyżówki sażana amurskiego i karpia z linii 3 (pokolenie F1), charakteryzują się wysoką odpornością na zakażenie CyHV-3

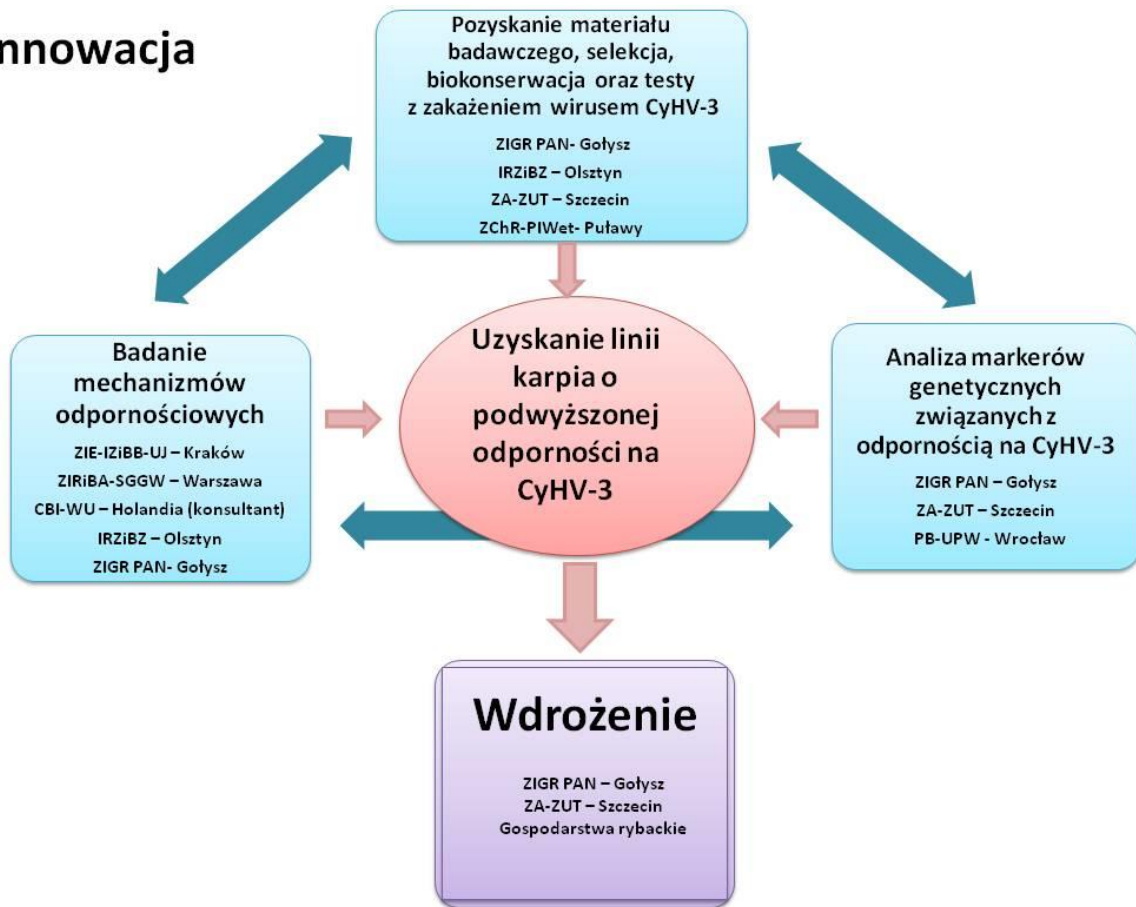
2. W pokoleniu F2 obserwuje się bardzo mały odsetek ryb podatnych na zakażenie wirusowe, co jest bardzo istotne w kontekście perspektywy identyfikacji markerów genetycznych związanych z odpornością na CyHV-3. Gdyby bowiem odporność na CyHV-3 była kontrolowana przez pojedynczy locus o diploidalnym modelu dziedziczenia, to należałoby się spodziewać, że około 25% ryb w pokoleniu F2 będzie podatne na CyHV-3.

W niniejszym projekcie założono utworzenie krzyżówek wstecznych (BC1F2) na bazie pokolenia F2 i linii rodzicielskiej ochabskiej (3). W ten sposób można osiągnąć jednocześnie dwa cele: 1) w pokoleniu krzyżówek zwrotnych BC1F2 zwiększa się odsetek ryb podatnych na zakażenia wirusowe co umożliwi identyfikację czynników genetycznych warunkujących odporność na CyHV-3 a z drugiej strony 2) krzyżówki BC1F2 mają znacznie większy udział genotypu linii 3 czyli genów związanych z pożądanymi cechami produkcyjnymi.

Kierując się powyższymi przesłankami, w 2016 roku tarlaki-lustrzenie pokolenia F2 zostały wykorzystane do krzyżowania wstecznego z linią rodzicielską ochabską (3) w celu poprawy parametrów produkcyjnych oraz pokroju ciała kolejnego pokolenia BC1F2. Jednocześnie chodziło o genetyczne utrwalenie typu ułuszczenia lustrzeń w tym i kolejnych pokoleniach (100% ryb pokolenia BC1F2 to lustrzenie - ssnn). Karpie te będą wykorzystane w eksperymentach pilotowych w celu określenia ich przeżywalności jak i innych parametrów hodowlanych istotnych dla akwakultury.

4. Koncepcja badań

Innowacja



Rycina 1. Schemat działań oraz udział poszczególnych członków konsorcjum w projekcie Działania mają na celu uzyskanie linii karpia o podwyższonej odporności na CyHV-3 oraz jej wdrożenie do hodowli stawowej w Polsce.

Konsorcjum, stanowi dopełniający się nawzajem team wykonawców, dobranych wg. kryterium wiedzy, doświadczenia i możliwości realizacji projektu. Lider konsorcjum PAN PAN-ZIGR w Gołyszach ma ponad 60 letnie doświadczenie w pracach hodowlanych i selekcyjnych, utrzymuje tzw. „żywy bank genów” karpia i prowadzi badania wykorzystując na co dzień markery genetyczne. Przykładem jest praca, która ukazała się w czasopiśmie *Aquaculture* w roku 2017 (Napora-Rutkowski i wsp., 2017) kompleksowo charakteryzująca genetycznie wszystkie linie hodowlane karpia w Polsce, w tym linie utrzymywane w Zatorze (IRŚ) i Jaktorowie (ZIRiBA-SGGW). Zadania przydzielone podmiotowi w ramach konsorcjum - przeprowadzenie krzyżowań i podchowów oraz analiza markerów genetycznych - dokładnie pokrywają się z obszarem kompetencji PAN-ZIGR w Gołyszach. Dodatkowo, należy podkreślić doświadczenie PAN-ZIGR w uczestnictwie jako partner w dużych projektach unijnych. Między innymi w projektach typu RTN (Sieci Badawczo-Szkoleniowe) - „PARITY” i „NEMO” w ramach 6 i 7 Ramowych Programów UE. Projekty te realizowane

były przez duże międzynarodowe konsorcja co umożliwiło nabycie niezbędnego „know-how” w zarządzaniu projektami i osiągnięciu założonych celów.

Pozostali uczestnicy konsorcjum tworzą logiczny ciąg umożliwiający kompleksowe wyodrębnienie fenomenu biologicznego na poziomach - genowym, białkowym, komórkowym, funkcjonalnym i fenotypowym.

Ostateczne rozstrzygnięcie aplikacyjności uzyskanych wyników odbędzie się przy udziale trzech gospodarstw rybackich które występują w projekcie zarówno jako podmioty przeprowadzające wdrożenie wyników a równolegle finalną korektę wartości genotypów uwzględniającą komponentę środowiskową oraz cechy typowo produkcyjne. Będzie to możliwe dzięki usytuowaniu gospodarstw rybackich w różnych częściach Polski:

4.1. Testy z zakażeniem wirusem CyHV-3.

Aktualnie ZIGR PAN w Gołyszcu utrzymuje selekty F1 i F2 pochodzące od linii ochabskiej (3) i sazana amurskiego (SA). Ryby te charakteryzują się wysoką odpornością na wirusa CyHV-3 co zostało potwierdzone poprzez eksperymentalne zakażenie. W ramach projektu przeprowadzone zostanie krzyżowanie wsteczne z wykorzystaniem tarlaków lustrzeni (ssnn) pokolenia F2 z karpami z linii rodzicielskiej ochabskiej (3). Jednocześnie rozrodzone będą linie rodzicielskie: ochabska (3) oraz sazan amurski (SA). W ten sposób otrzyma się trzy grupy genetyczne: (a) linia czysta 3 (ochabska), (b) linia czysta SA (sazan amurski) i (c) krzyżówki wsteczne BC1F2 (F2x3).

Ryby te będą wykorzystane do określenia przeżywalności karpki krzyżówki wstecznej BC1F2 oraz linii rodzicielskich ochabskiej 3 i sazana amurskiego (SA) podczas eksperymentalnego zakażenia wirusem CyHV-3. Dodatkowo zostaną pobrane i zabezpieczone próbki tkanek do badań porównawczych krzyżówki z liniami rodzicielskimi oraz markerów odporności.

4.2. Analiza markerów genetycznych

Celem tych działań jest lokalizacja markerów SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) w genomie karpia wykazujących ścisłą korelację z odpornością przeciwwirusową (przeżywalnością) na zakażenie CyHV-3. Cel ten planuje się osiągnąć stosując nowoczesną metodę genotypowania ryb za pomocą sekwencjonowania nowej generacji (GBS; ang. *Genotyping By Sequencing*). Planowane jest uzyskanie genotypów osobników karpki BC1F2 podatnych i odpornych na zakażenie wirusem CyHV-3. Osobniki te wyodrębnione zostaną w testach ostrych z zakażeniem tym wirusem. Planujemy dokonanie

analizy roli zidentyfikowanych markerów SNP w połączeniu z funkcjonalnymi różnicami w działaniu układu odpornościowego. Innymi słowy autorzy projektu podejmą próbę powiązania funkcjonalnego markerów SNP związanych z wyższą przeżywalnością/śmiertelnością z konkretnymi mechanizmami immunologicznymi. Takie podejście nie tylko dostarczy odpowiedzi na główne pytanie, które markery warunkują lepszą odporność antywirusowa, ale też dlaczego tak się dzieje.

W kolejnym etapie działania karpie grupy BC1F2 chowane w sadzach na wodzie po cieplowniczej powinny osiągnąć dojrzałość płciową ze względu na wydłużony sezon temperatury efektywnej wody, połączony z intensywnym tuczem. Dojrzałe płciowo lustrzenie zostaną zgenotypowane dla wyselekcjonowanych markerów SNP związanych z odpornością. W wyniku przeprowadzonych prac powstanie baza danych zawierająca indywidualne genotypy pozakowanych osobników. Karpie będą genotypowane pod względem wybranych SNP powiązanych z odpornością na wirusa CyHV-3.

5. Prace selekcyjne i weryfikacja wyników

Do rozrodu zostaną wybrane osobniki heterozygotyczne względem wytypowanych poprzednio, poszczególnych markerów SNP. Kryteria wyboru markerów z oryginalnie dostępnego panelu obejmują ich (wysoki) efekt addytywny na analizowane cechy oraz położenie w genomie. Preferowane będą polimorfizmy zlokalizowane w genach będące potencjalnymi mutacjami sprawczymi, a w przypadku markerów zlokalizowanych w regionach międzygenowych kryterium wyboru będzie polegało na uzyskaniu markerów zlokalizowanych blisko egzonów, z zachowaniem zasady, że każdy marker „reprezentuje” pojedynczy gen oraz przy możliwie niskiej korelacji pomiędzy markerami wyrażonej współczynnikiem zaburzenia równowagi Hardyego-Weinberga.

Planuje się otrzymanie kilkudziesięciu segregujących grup doświadczalnych w wyniku kojarzenia heterozygotycznych osobników rodzicielskich BC1F2. W ten sposób w każdej potomnej grupie doświadczalnej (BC1F3) obecne będą osobniki homozygotyczne - posiadające dwie kopie pożądanego allela (markera SNP), heterozygoty oraz osobniki nie będące nosicielami konkretnego markera (tu i dalej będziemy je nazywać podgrupami genetycznymi).

Uzyskane karpie będą poddane testowi ostremu w kierunku odporności na CyHV-3. Wylęgiem krzyżówek BC1F3 zostaną obsadzone stawy produkcyjne należące do gospodarstw rybackich usytuowanych w różnych częściach Polski. W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskamy obiektywne dane na temat przydatności poszczególnych krzyżówek do produkcji

stawowej. Ocenie również zostanie poddany plejotropowy efekt markerów SNP na cechy związane z wydajnością produkcyjną oraz modyfikujący wpływ środowiska. Możliwe będzie również:

1. Porównania przeżywalności w podgrupach genetycznych krzyżówek różniących się między sobą obecnością lub brakiem markerów SNP
2. Określenia udziału poszczególnych markerów w kontroli odporności na CyHV-3.
3. Estymacji efektów nieaddytywnych (dominacyjnych i epistatycznych) oraz plejotropowych wyselekcjonowanych SNP.

Literatura

1. Białywaś, H., Irnazarow, I., Rakus, K., Jurecka, P., Pilarczyk A., 2008. Carp Breeds of Poland, in: Bogeruk, A.K., (Ed.), Catalogue of carp breeds (*Cyprinus carpio* L.) of the countries of Central and Eastern Europe. Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Moscow, pp. 74-97.
2. Das Mahapatra K., Gjerde B., Sahoo P.K., Saha J.N., Barat A., Sahoo M., Mohanty B.R., Ødegård J., Rye M., Salte R. 2008. Genetic variations in survival of rohu carp (*Labeo rohita*, Hamilton) after *Aeromonas hydrophila* infection in challenge tests. *Aquaculture* 279: 29-34.
3. Fjalestad K.T., Gjedrem T., Gjerde B. 1993. Genetic improvement of disease resistance in fish: an overview. *Aquaculture* 111: 65-74.
4. Gjedrem T., Salte R., Gjøen H.M. 1991. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture*, 97: 1-6.
5. Jurecka P., Wiegertjes G.F., Rakus K.Ł., Pilarczyk A., Irnazarow I. (2009). Genetic resistance of carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Trypanoplasma borreli*: Influence of transferrin polymorphism. *Vet. Immunol. Immunopathol.*; 127: 19-25
6. MacCarthy E.M., Burns I., Irnazarow I., Polwart A., Greenhough T.J., Shrive A.K., Hoole D. 2008. Serum CRP-like protein profile in common carp *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Dev. Comp. Immunol.*; 32: 1281-1289.
7. Midtlyng P.J., Storset A., Michel C., Slierendrecht W.J., Okamoto N. 2002. Breeding for disease resistance in fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 22: 166-172.
8. Napora-Rutkowski, Ł., Rakus, K., Nowak, Z., Szczygieł, J., Pilarczyk, A., Ostaszewska, T., Irnazarow, I., 2017. Genetic diversity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains breed in Poland based on microsatellite, AFLP, and mtDNA genotype data. *Aquaculture* 473, 433–442. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.03.005
9. Piackova V., Flajshans M., Pokorova D., Reschova S., Gela D., Cizek A., Vesely T. 2013. Sensitivity of common carp, *Cyprinus carpio* L., strains and crossbreeds reared in the Czech Republic to infection by cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3; KHV). *J Fish Dis*, 36:75-80.
10. Rakus, K.Ł., Wiegertjes, G.F., Adamek, M., Siwicki, A.K., Lepa, A., Irnazarow, I., 2009. Resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to Cyprinid herpesvirus-3 is influenced by major histocompatibility (MH) class II B gene polymorphism. *Fish Shellfish Immunol* 26,737-743.
11. Rakus, K.Ł., Irnazarow, I., Adamek, M., Palmeira, L., Kawana, Y., Hirono, I., Kondo, H., Matras, M., Steinhagen, D., Flasz, B., 2012. Gene expression analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) lines during Cyprinid herpesvirus 3 infection yields insights into differential immune responses. *Dev. Comp. Immunol.* 37, 65-76.