

# Genotypowanie i selekcja ryb łososiowatych w akwakulturze

Konrad Ocalewicz  
Zakład Biologii i Ekologii Morza  
Wydział Oceanografii i Geografii  
Uniwersytet Gdański  
Gdynia 16.10.2019 r.





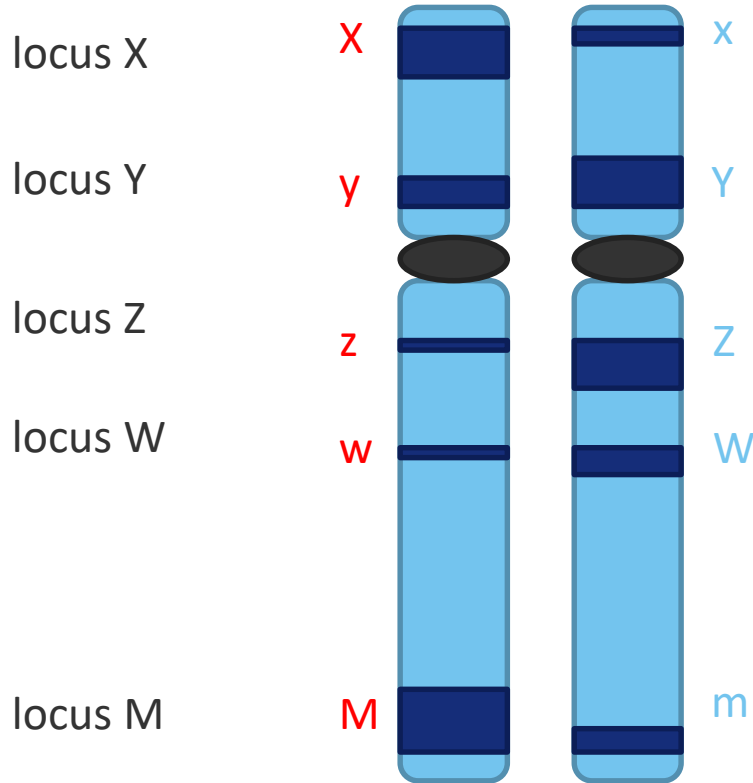
## Genotypowanie i selekcja ryb łososiowatych w akwakulturze:

1. Definicja.
2. Genotypowanie poprzez analizę powielonych fragmentów DNA.
3. Genotypowanie z zastosowaniem Sekwencjonowania Następnej Generacji (NGS).
4. Zastosowanie genotypowania w praktyce:
  - ochrona pul genetycznych populacji i linii ryb,
  - identyfikacja gatunków i krzyżówek ryb,
  - identyfikacja genetycznej płci ryb,
  - programy selekcyjne i hodowlane.



Allel 1

Allel 2



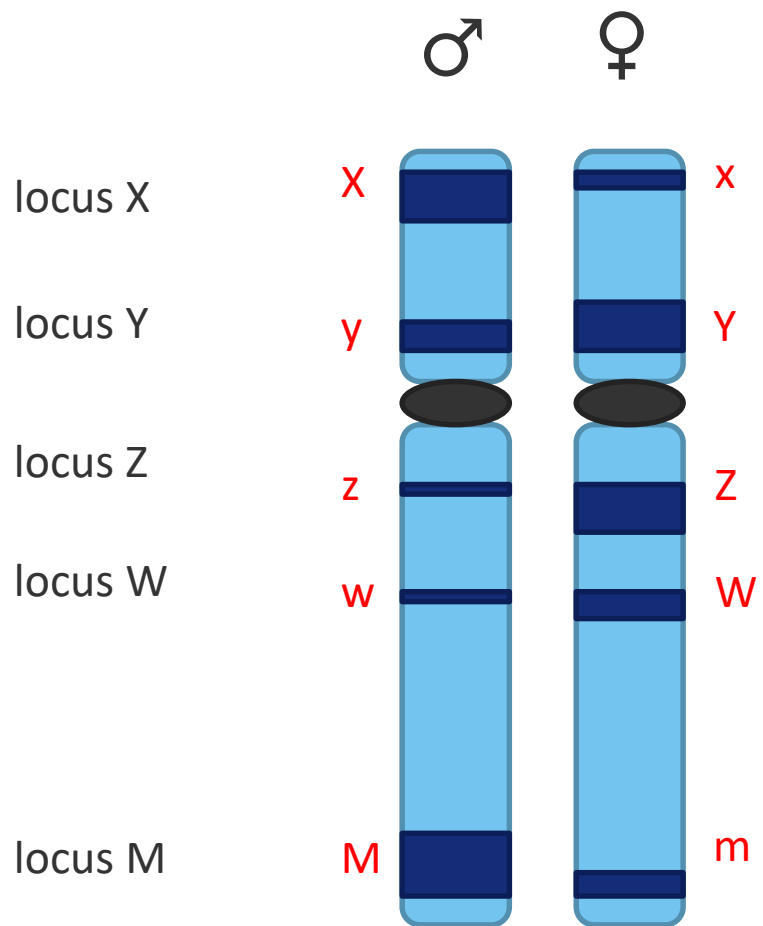
## Polimorfizm DNA:

**Allel** – jedna z wersji genu. Allele tego samego genu mogą różnić się jednym lub kilkoma nukleotydami.

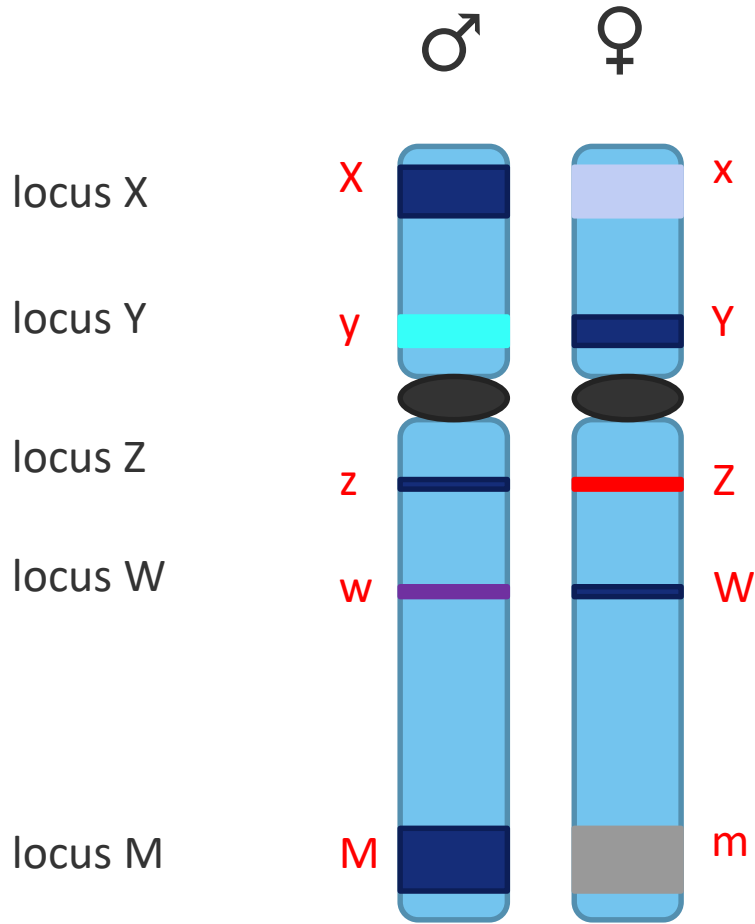
Istnienie więcej niż jednej wersji danego genu określa się jako polimorfizm.

**Genotypowanie** to nic innego jak identyfikacja tych polimorfizmów i różnic między osobnikami

# Polimorfizm długości mikrosatelitarnego DNA

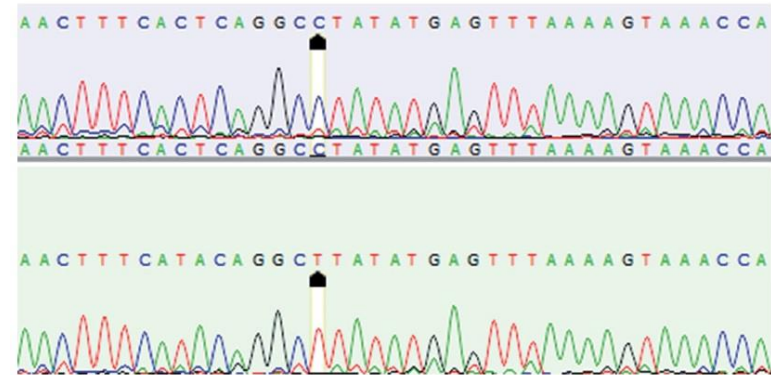
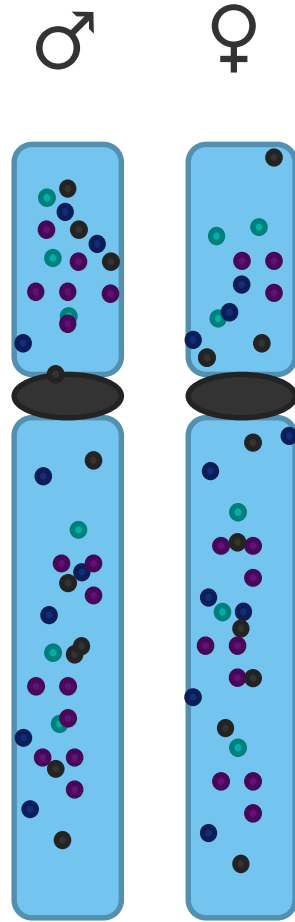


Różnice w składzie nukleotydów przy zachowaniu takiej samej długości fragmentów DNA - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych



# Polimorfizm pojedynczych nukleotydów (Single Nucleotide Polymorphism) - SNP

Dziesiątki tysięcy loci

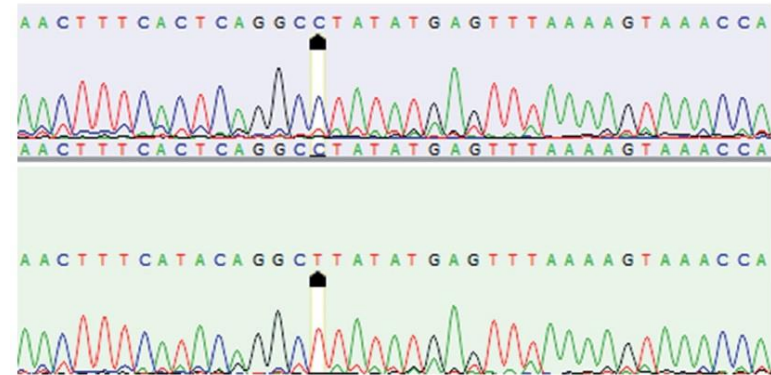
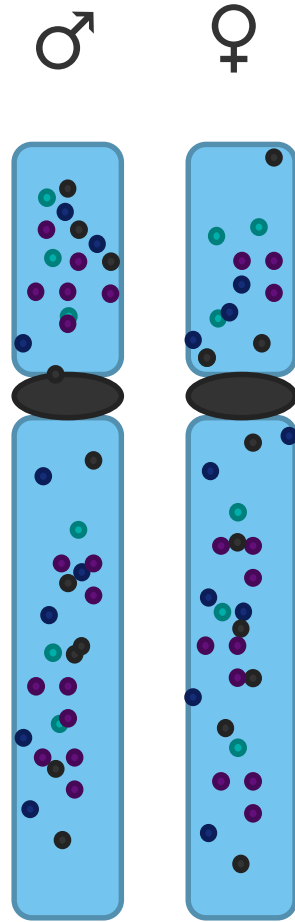


Kowalczyk i in. 2018 *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*

**Uzyskiwanie markerów molekularnych poprzez  
zastosowanie sekwencjonowania genomów przy  
pomocy techniki  
Sekwencjonowania Nowej Generacji  
(NGS, ang. next generation sequencing)**

# Polimorfizm pojedynczych nukleotydów (Single Nucleotide Polymorphism) - SNP

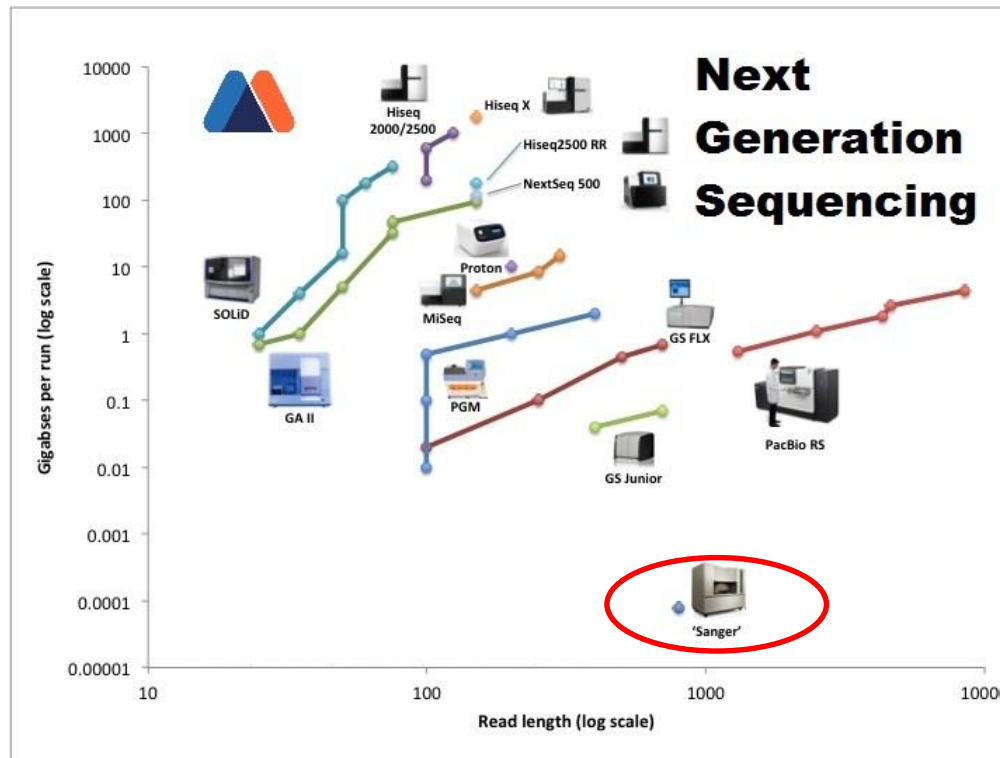
Dziesiątki tysięcy loci



Kowalczyk i in. 2018 *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*



# Identyfikacja polimorfizmu SNP przy wykorzystaniu metody sekwencjonowania NGS

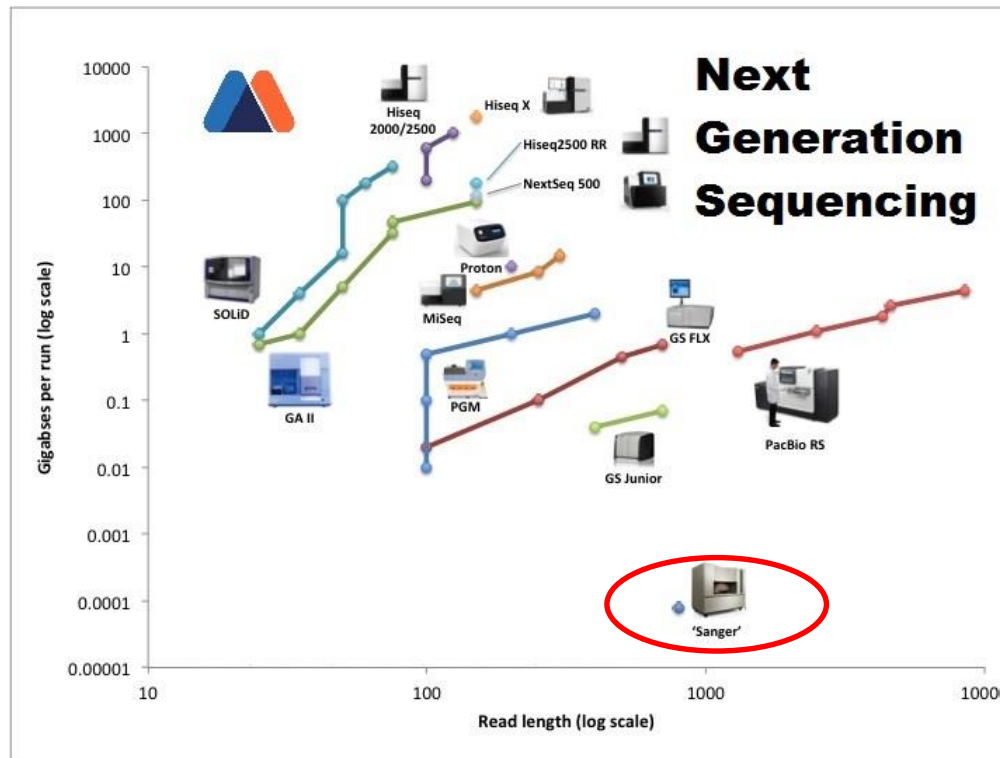


metoda Sangera – sekwencjonowanie pojedynczego fragmentu do 1000 pz w jednym „runie”



metoda NGS – sekwencjonowanie kilku/kilkunastu tysięcy fragmentów o długości kilkudziesięciu lub kilkuset pz w tym samym czasie!!!

# Uzyskiwanie markerów genetycznych na drodze sekwencjonowania DNA



Praktycznym wykorzystaniem wyników otrzymywanych metodami NGS jest wyodrębnianie na podstawie wykrytych polimorfizmów alleli wykazujących asocjacje z cechami użytkowymi.

**QTL** (Quantitative Trait Loci) – *locus* cechy ilościowe, rejony genomu, które zawierają geny związane z określoną cechą ilościową taką jak np. tempo wzrostu, płodność, odporność na choroby wirusowe

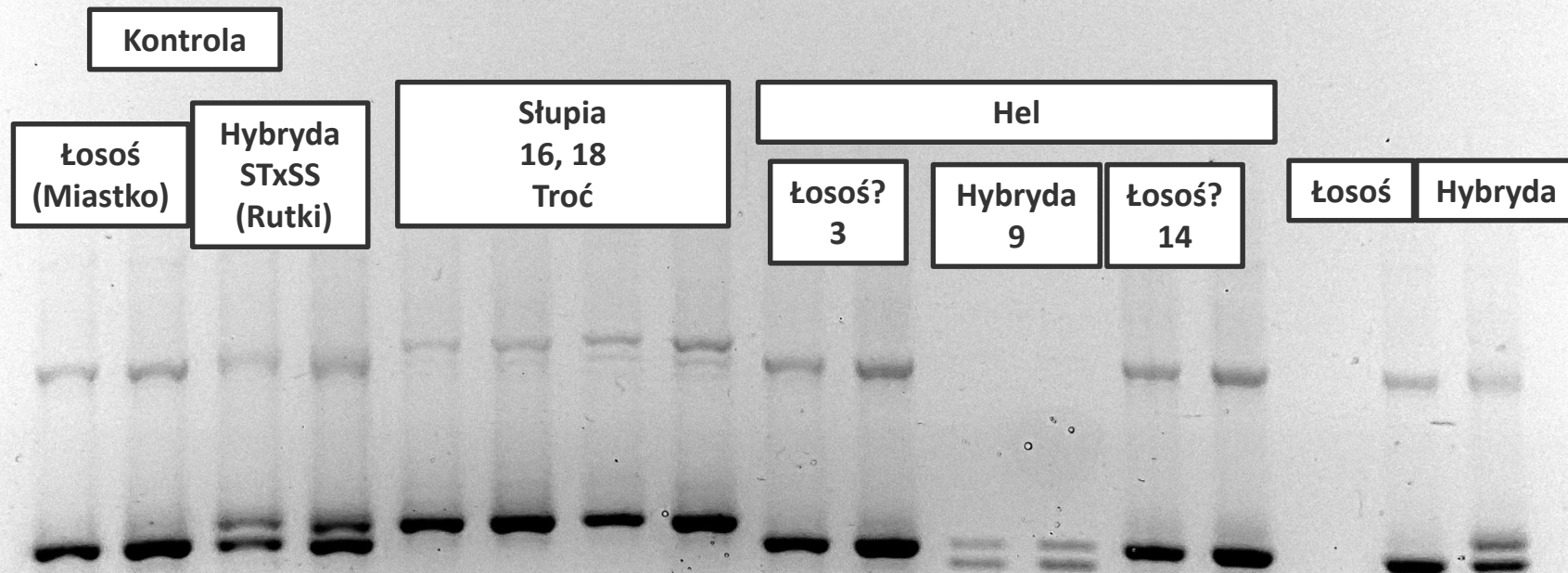




# Zastosowanie technik genotypowania w praktyce

# Analiza długości mikrosatelitarnego DNA:

Genotypowanie w celu identyfikacji osobników należących do różnych gatunków i ich krzyżówek



## Analiza długości mikrosatelitarnego DNA:

### Zastosowanie genotypowania ryb w pracach, których celem jest utrzymanie dużej zmienności genetycznej stada

Alleles (expressed in bp) at investigated loci detected within the genome in the investigated *P. spathula*

Fish No.	Sex	Locus															
		<i>Psp18</i>		<i>Psp28</i>		<i>Psp26</i>		<i>Psp21</i>		<i>Psp20</i>		<i>Psp32</i>		<i>Psp29</i>			
pog 1	F	170	170	250	250	138	152	150	152	208	210	179	181	195	203	211	215
pog 2	F	170	170	244	246	136	138	146	150	208	210	181	181	195	203	211	215
pog 3	F	170	170	244	246	138	142	146	150	208	210	181	181	195	203	211	211
pog 5	F	170	170	244	246	136	142	150	152	210	210	181	181	195	203	211	215
pog 6	F	170	170	230	254	136	142	146	152	208	210	181	181	195	203	211	215
pog 10	F	170	170	230	244	138	152	150	150	210	210	181	181	195	203	211	215
pog 14	F	170	170	244	246	138	142	150	150	210	210	181	181	195	195	211	211
pog 9	M	168	170	244	246	138	152	150	150	210	210	181	181	195	203	211	215
pog 13	M	170	170	246	254	136	142	146	150	208	210	179	181	195	203	211	215
pog 19	M	170	170	246	254	138	138	150	150	208	210	181	181	195	203	211	215
pog 20	M	170	170	246	254	138	138	150	154	208	210	181	181	195	203	211	215
pog 22	M	170															



## Analiza długości mikrosatelitarnego DNA:

Zastosowanie genotypowania ryb w pracach, których celem jest utrzymanie dużej zmienności genetycznej stada

**Dobieranie par tarlaków do tarła na podstawie screeningu genetycznego – duża zmienność daje duże pole manewru do prac selekcyjnych**

Potential heterozygosity of offspring cohort ( $h$ ), weak heterozygotes ( $wh$ ), allelic richness (number of alleles in offspring cohort) ( $ar$ ), and  $v$  index ( $v$ ) in the progeny of the *P. spathula* spawning pairs analyzed

Male		Female No.										
No.	indicator	pog 1	pog 2	pog 3	pog 5	pog 6	pog 10	pog 14	pog 15	pog 16	pog 17	pog 21
pog 9	$h$	0.64	0.54	0.54	0.50	0.71	0.39	0.39	0.43	0.61	0.50	0.64
	$wh$	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.17	0.08	0.08	0.00	0.00
	$ar$	17	16	16	16	20	14	14	15	18	16	17
	$v$	0.90	0.82	0.78	0.80	1.00	0.70	0.62	0.70	0.86	0.80	0.90
pog 13	$h$	0.68	0.57	0.57	0.57	0.57	0.64	0.57	0.54	0.61	0.61	0.61
	$wh$	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.17	0.08	0.08	0.00	0.00
	$ar$	19	17	17	17	17	19	17	16	18	18	18
	$v$	0.96	0.86	0.82	0.86	0.86	0.94	0.78	0.78	0.86	0.90	0.90
pog 19	$h$	0.57	0.46	0.46	0.54	0.61	0.43	0.39	0.46	0.54	0.50	0.46
	$wh$	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.17	0.08	0.08	0.00	0.00
	$ar$	16	15	15	16	17	15	14	15	16	16	15
	$v$	0.84	0.76	0.72	0.82	0.88	0.74	0.62	0.72	0.78	0.80	0.76

# Zastosowanie genotypowania ryb w pracach, których celem jest utrzymanie dużej zmienności genetycznej stada

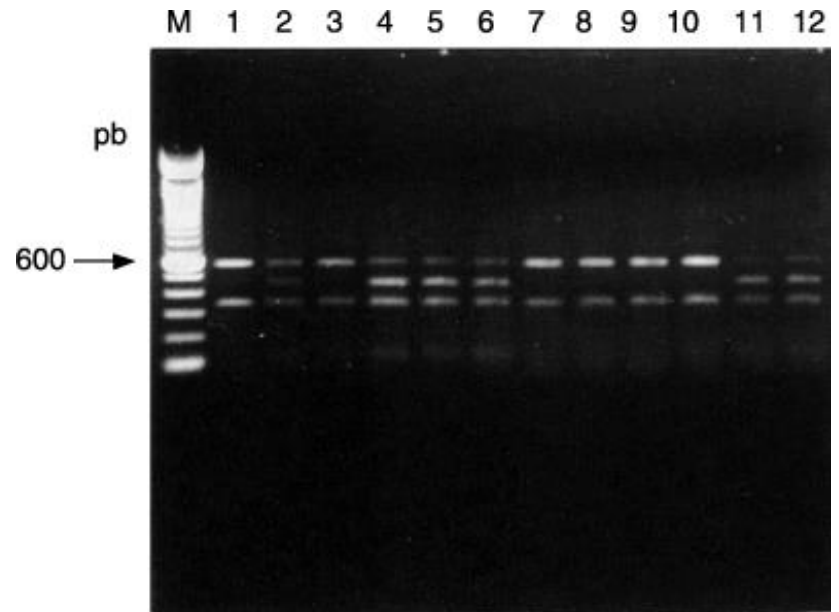
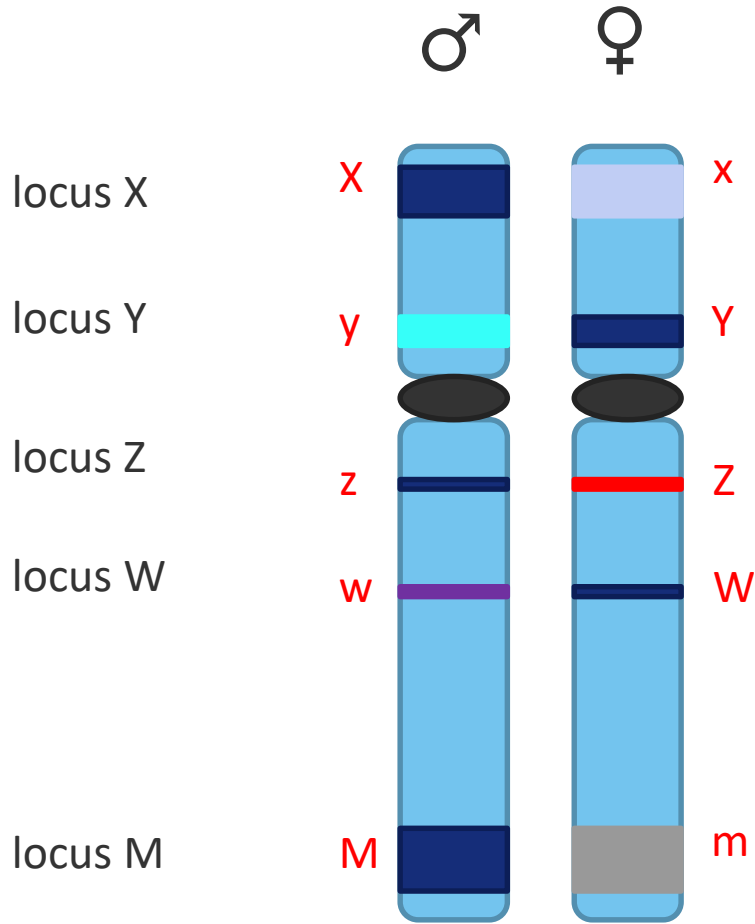
## Wiosłonos amerykański

Potential heterozygosity of offspring cohort (*h*), weak heterozygotes (*wh*), allelic richness (number of alleles in offspring cohort) (*ar*), and *v* index (*v*) in the progeny of the *P. spathula* spawning pairs analyzed

Male		Female No.										
No.	indicator	pog 1	pog 2	pog 3	pog 5	pog 6	pog 10	pog 14	pog 15	pog 16	pog 17	pog 21
pog 9	<i>h</i>	0.64	0.54	0.54	0.50	0.71	0.39	0.39	0.43	0.61	0.50	0.64
	<i>wh</i>	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.17	0.08	0.08	0.00	0.00
	<i>ar</i>	17	16	16	16	20	14	14	15	18	16	17
	<i>v</i>	0.90	0.82	0.78	0.80	1.00	0.70	0.62	0.70	0.86	0.80	0.90
pog 13	<i>h</i>	0.68	0.57	0.57	0.57	0.57	0.64	0.57	0.54	0.61	0.61	0.61
	<i>wh</i>	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.17	0.08	0.08	0.00	0.00
	<i>ar</i>	19	17	17	17	17	19	17	16	18	18	18
	<i>v</i>	0.96	0.86	0.82	0.86	0.86	0.94	0.78	0.78	0.86	0.90	0.90
pog 19	<i>h</i>	0.57	0.46	0.46	0.54	0.61	0.43	0.39	0.46	0.54	0.50	0.46
	<i>wh</i>	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.17	0.08	0.08	0.00	0.00
	<i>ar</i>	16	15	15	16	17	15	14	15	16	16	15
	<i>v</i>	0.84	0.76	0.72	0.82	0.88	0.74	0.62	0.72	0.78	0.80	0.76

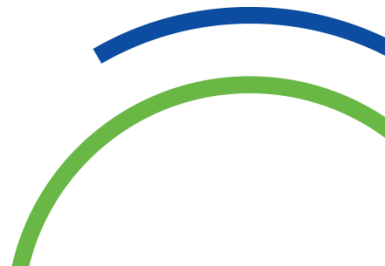


# Identyfikacja genotypu płci pstrąga tęczowego - analiza polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych



Genotypowanie płci pstrąga tęczowego (samiec no. 4-6, 11, 12)

# Zastosowanie genotypowania w programach selekcyjnych



# Proces selekcji - postęp hodowlany – praca hodowlana

Doskonaleniu zwierząt z pokolenia na pokolenie w celu uzyskania osobników potomnych o lepszych parametrach użytkowych niż osobniki rodzicielskie [Ptak i in. 2015].

1. Dziedziczalność danej cechy.
2. Selekcja odpowiednich osobników do dalszej hodowli.



Normal Cow



Belgian Blue

# ODZIEDZICZALNOŚĆ CECH

Za każdy fenotyp odpowiada interakcja **genotypu** ze **środowiskiem**

- Odziedziczalność: proporcja zmienności fenotypowej wyjaśnianej zmiennością genetyczną w populacji

Jest to miara udziału cech dziedzicznych **w zmienności fenotypu**

Wskaźnik odziedziczalności  $h^2$  (*ang. heritability 0-1*)

Wartość **1** oznacza, że zmienność danej cechy zależy tylko od genów.  
Odziedziczalność **mniejsza od 1** wskazuje także na rolę czynników środowiskowych

# Odziedziczalność – nie wszystkie cechy są odziedziczalne w tym samym stopniu!

Species	Trait	Heritability Estimate	Reference
Rainbow trout	Body weight	0.35±0.30	Henryon et al. (2002)
Rainbow trout	Body length	0.53±0.27	Henryon et al. (2002)
Rainbow trout	Disease resistance	0.13	Henryon et al. (2002)
Rainbow trout	Body weight	0.41	Gjerde and Schaeffer (1989)
Rainbow trout	Flesh colour	0.29	Gjerde and Schaeffer (1989)
Rainbow trout	Spawning time	0.66	Quinton et al. (2002)
Rainbow trout	Carcass yield	0.50	Chevassus et al. (2002)
Atlantic salmon	Body weight	0.22-0.34	Rye and Mao (1998)
Atlantic salmon	Body weight	0.24	Gjerde et al. (1994)
Atlantic salmon	Growth rate	0.04-0.26	Gjerde et al. (1994)
Atlantic salmon	Sexual maturity	0.34	Gjerde et al. (1994)
Coho salmon	Alevin weight	0.52-0.80	Martínez et al. (1999)
Marron	Growth rate	0.35	Henryon et al. (1999)
Marron	Survival (eggs)	0.02	Henryon et al. (1999)
White shrimp	Harvest weight	0.70	Argue et al. (2002)
Tilapia	Body weight	0.55	Bolivar and Newkirk (2002)
Catfish	Body weight	0.27-0.62	Bondari (1986)
Turbot	Body weight	0.70	Gjerde et al. (1997)

# Odziedziczalność – nie wszystkie cechy są odziedziczalne w tym samym stopniu!

Species	Trait	Heritability Estimate	Reference
Rainbow trout	Body weight	0.35±0.30	Henryon et al. (2002)
Rainbow trout	Body length	0.53±0.27	Henryon et al. (2002)
Rainbow trout	Disease resistance	0.13	Henryon et al. (2002)
Rainbow trout	Body weight	0.41	Gjerde and Schaeffer (1989)
Rainbow trout	Flesh colour	0.29	Gjerde and Schaeffer (1989)
Rainbow trout	Spawning time	0.66	Quinton et al. (2002)
Rainbow trout	Carcass yield	0.50	Chevassus et al. (2002)
Atlantic salmon	Body weight	0.22-0.34	Rye and Mao (1998)
Atlantic salmon	Body weight	0.24	Gjerde et al. (1994)
Atlantic salmon	Growth rate	0.04-0.26	Gjerde et al. (1994)
Atlantic salmon	Sexual maturity	0.34	Gjerde et al. (1994)
Coho salmon	Alevin weight	0.52-0.80	Martínez et al. (1999)
Marron	Growth rate	0.35	Henryon et al. (1999)
Marron	Survival (eggs)	0.02	Henryon et al. (1999)
White shrimp	Harvest weight	0.70	Argue et al. (2002)
Tilapia	Body weight	0.55	Bolivar and Newkirk (2002)
Catfish	Body weight	0.27-0.62	Bondari (1986)
Turbot	Body weight	0.70	Gjerde et al. (1997)

# Wybrane kategorie cech użytkowych, które są celem prac hodowlanych (EU)

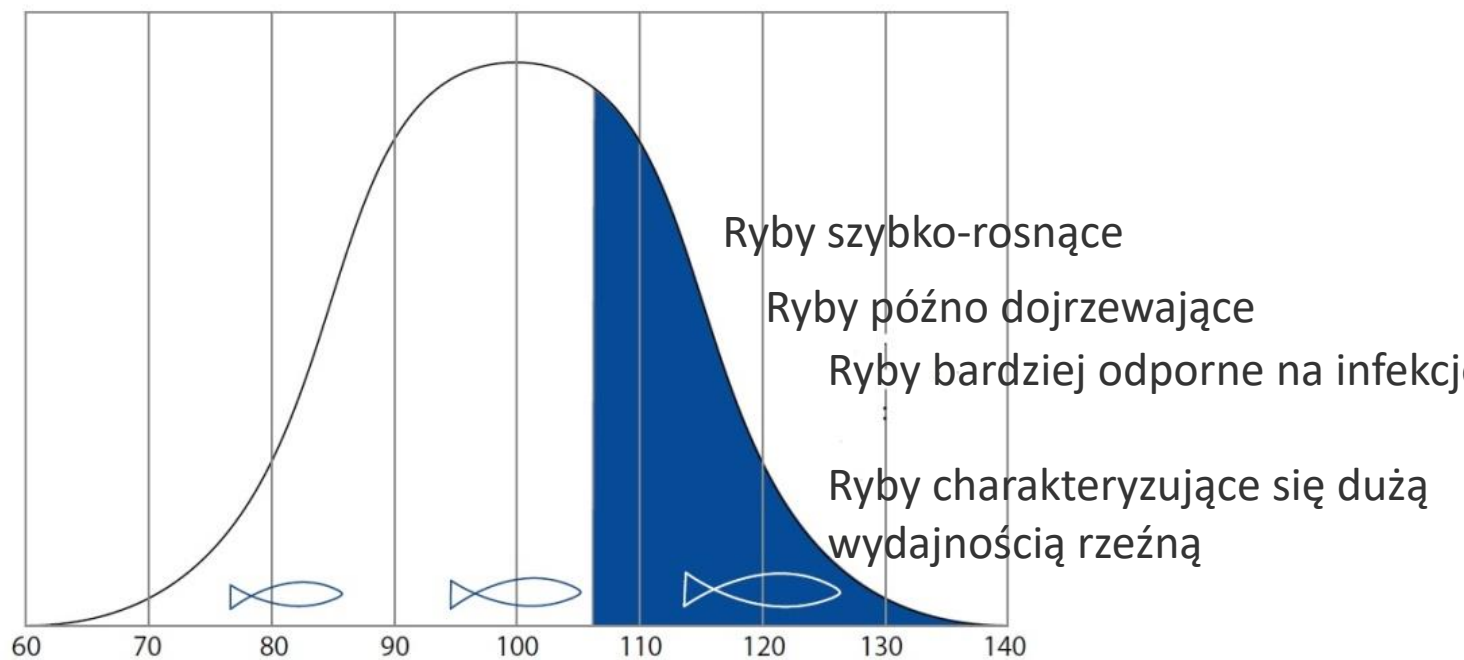
	wzrost	morfologia	Odporność na choroby	Wydajność przetwórcza	Jakość - filet	Dojrzałość płciowa, płodność	Żywnienie
dorada	6	4	2	0	2	0	1
sea bass	6	4	1	2	1	1	1
turbot	2	0	1	0	0	0	0
pstrąg tęczowy	10	8	5	5	3	5	2
łosoś	7	3	7	6	6	2	2
karp	4	4	2	1	0	1	0



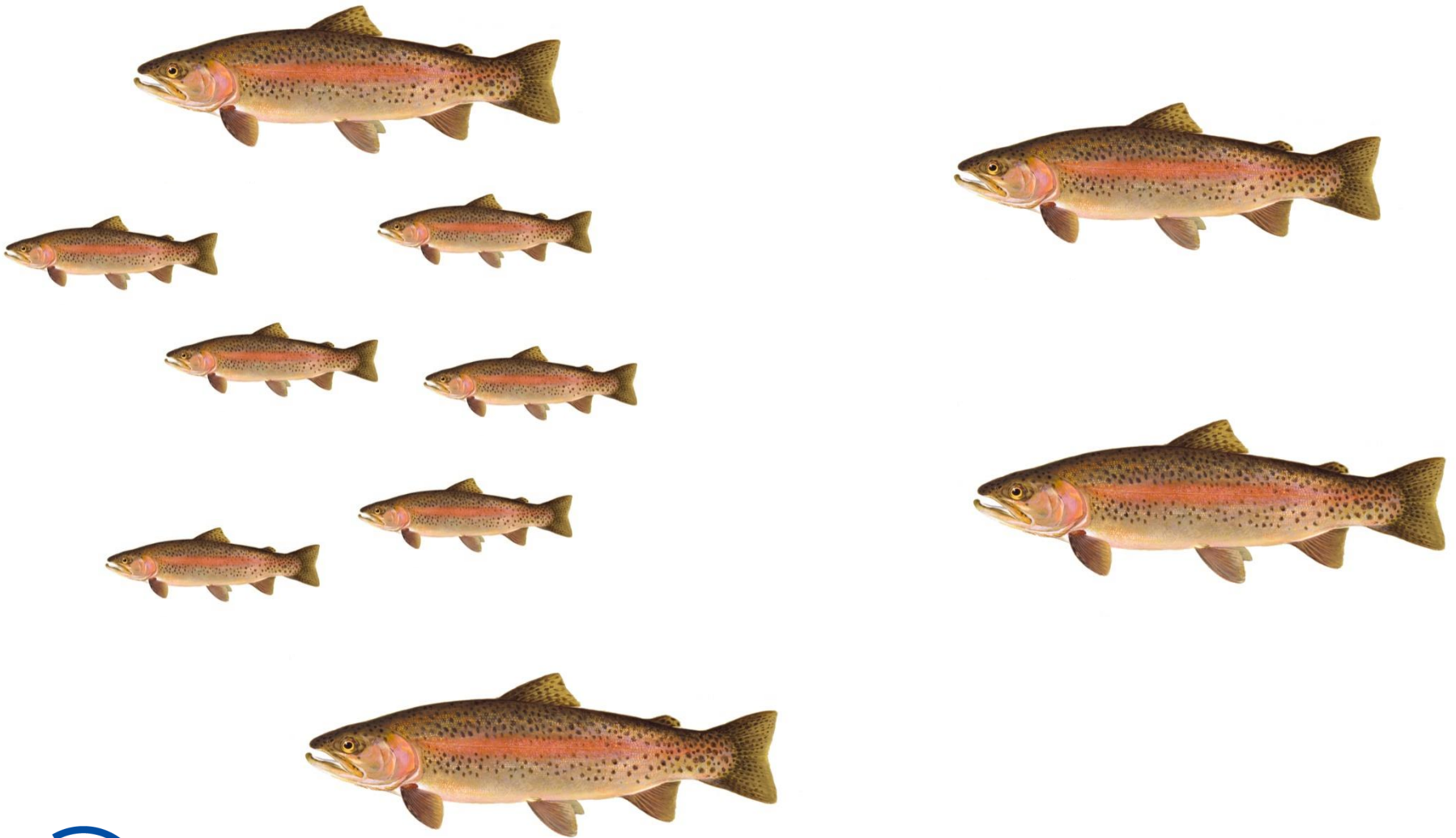
**Istotnym etapem każdej pracy hodowlanej  
jest selekcja odpowiednich osobników do  
dalszej hodowli**



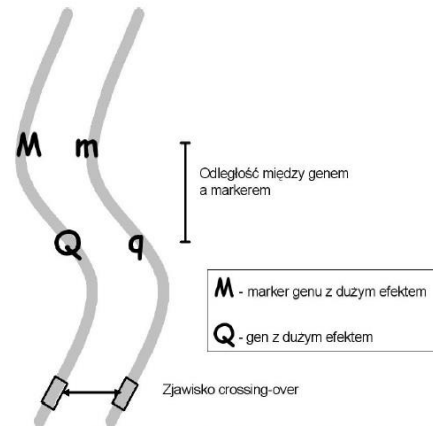
# Istotnym etapem każdej pracy hodowlanej jest selekcja odpowiednich osobników do dalszej hodowli



# Selekcja fenotypowa



# Selekcja osobników do programu hodowlanego i markery genetyczne



Lokalizacja locus genu cechy jakościowej i jego markera na chromosomie.

## Selekcja z wykorzystaniem genetyki molekularnej ma zastosowanie szczególnie wtedy, gdy:

- odziedziczalność cechy jest niska – wykorzystując dodatkowe źródła informacji o genach można w istotny sposób zwiększyć dokładność oceny,
- ekonomicznie ważna cecha objawia się u tylko u osobników jednej płci,
- jeśli cecha ujawnia się stosunkowo późno od wyklucia, w szczególności po jego śmierci (np. cechy związane z jakością mięsa),
- występują wysokie koszty oceny na podstawie potomstwa.

# Selekcja wspomagana markerami genetycznymi: Marker Assisted Selection

## **Tworzenie stada wyjściowego**

Selekcja wewnątrz-rodzinowa, krzyżowanie między rodzinami.

## **Mapowanie loci cech ilościowych QTL:**

Opracowanie map genetycznych sprzężeń, fenotypowa analiza cech.

## **Walidacja loci cech ilościowych**

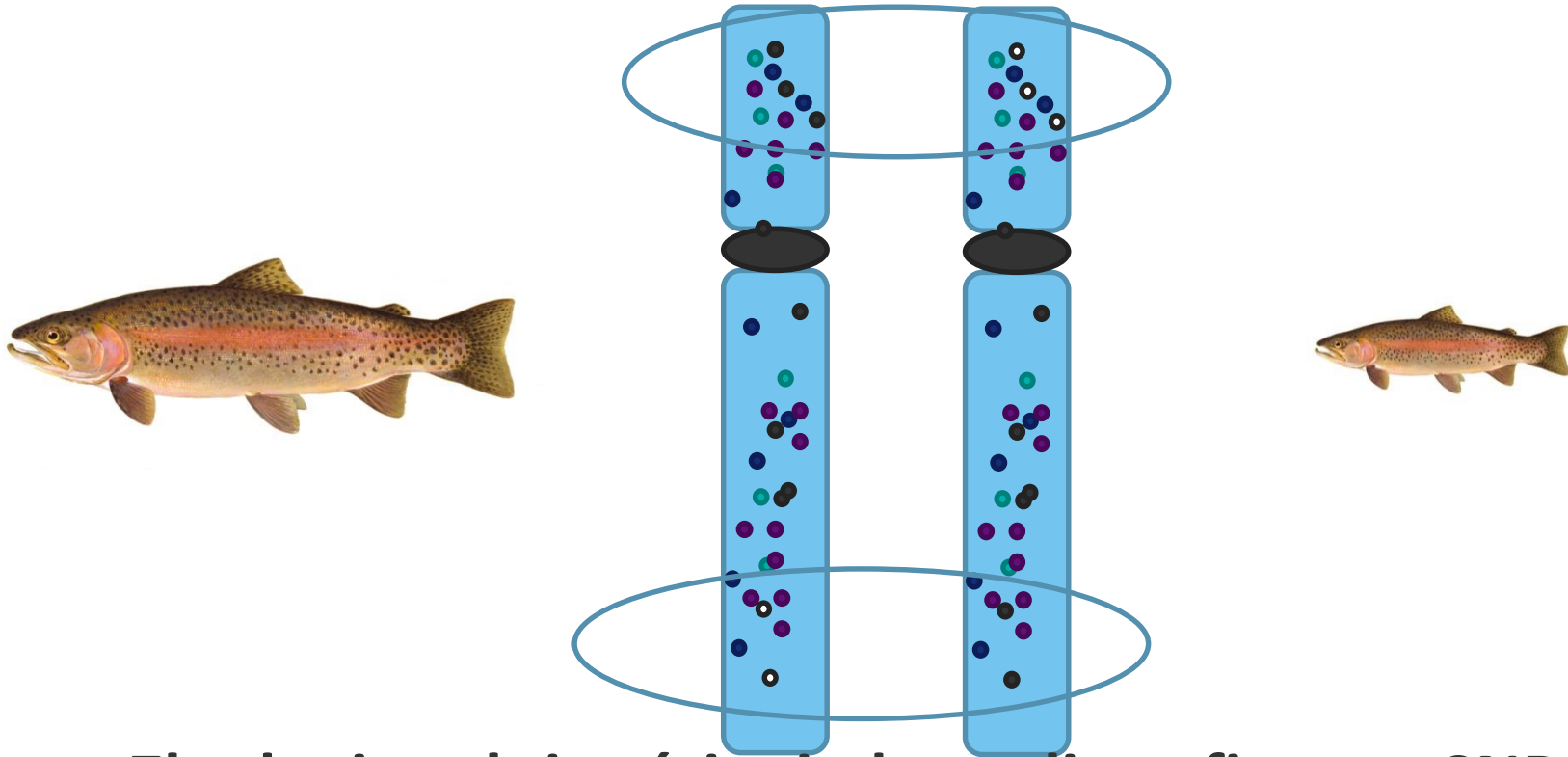
Potwierdzenie umiejscowienia i efektu QTL.  
Weryfikacja QTL na innych liniach, mapowanie genów wpływających na cechę.

## **Testowanie markerów sprzężonych z cechą:**

identyfikacja polimorficznych sekwencji DNA (markerów) położonych w sąsiedztwie QTL i dziedziczonych razem z nimi. Sprawdzenie markerów na materiale hodowlanym.

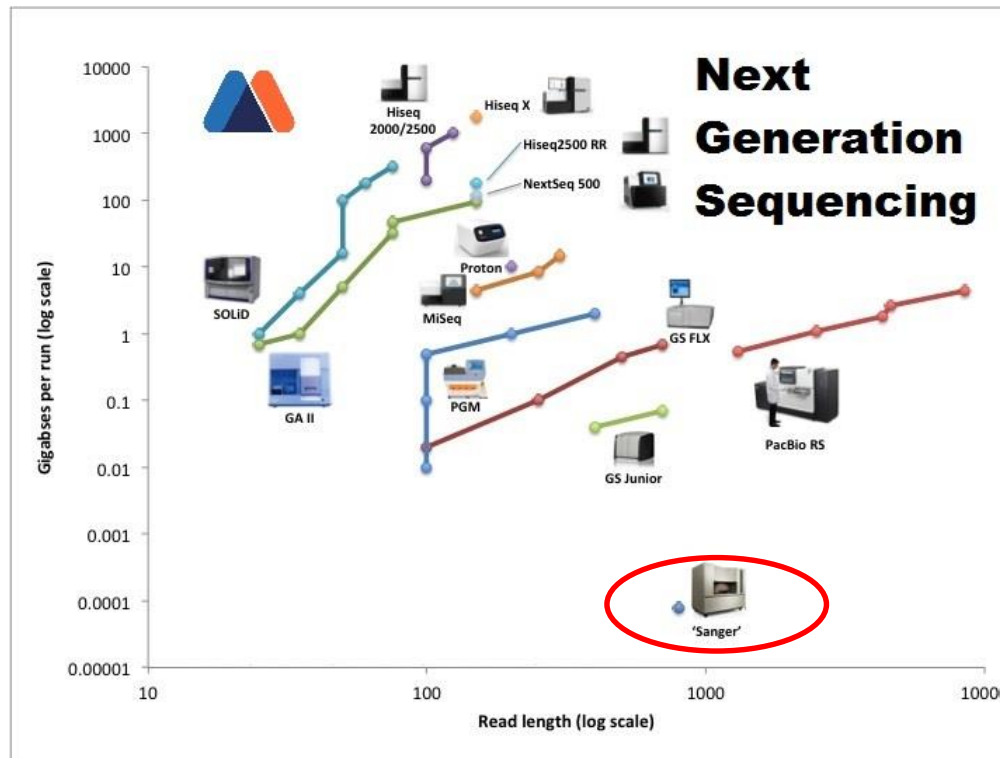
**Prowadzenie selekcji z wykorzystaniem markerów  
DNA (MAS)**

# Genotypowanie przez sekwencjonowanie



Zbadanie zależności między polimorfizmem SNP i genem(ami) (QTLs) kodującym np. tempo wzrostu

# Uzyskiwanie markerów genetycznych na drodze sekwencjonowanie DNA



1. Przygotowanie paneli (mikromacierzy genotypowych) pozwalających na jednoczesne zidentyfikowanie setek lub tysięcy polimorficznych SNP.
2. Wsparte analizą statystyczną mają zdolność wykrywania przybliżonej lokalizacji QTL.
3. Genotypowanie ryb z różnych linii, stad i szczepów.
4. Badanie asocjacji cech fenotypowych ze wzorem SNP - QTL
5. Selekcja do dalszych prac hodowlanych tylko ryb o określonym profilu genetycznym dającym przewidywalny efekt. SELEKCJA GENOTYPOWA

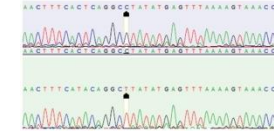
**Wydajność przetwórcza – fillet yield.** Uzyskiwanie markerów molekularnych związanych z QTL (genami warunkującymi cechą ilościową) w tym przypadku jest to duża wydajność przetwórcza pstrągów tęczowych



panel z 57 tyś. SNP-ów



**1487** osobników (o wadze ok. 1.5 kg) z kilkudziesięciu rodzin



w sumie przeanalizowano ponad **38 tyś SNP-ów**

znaleziono 2 grupy 25 SNP-ów na chromosomie 28, które odpowiadały za 1.4% i 1.1% genetycznej zmienności dot. wydajności rzeźnej

62% tych SNP-ów zlokalizowano w genach odpowiedzialnych za metabolizm lipidów, insuliny, aktywność kanałów kationowych 38% - zlokalizowanych było w pobliżu tych genów

Zbudowanie baz genetycznych danych dotyczących  
zgenotypowanych ryb – powstanie banków  
genotypów w postaci zamrożonego nasienia...





# Programy selekcji genomowej w akwakulturze

**Table 1.** Summary of species, traits, genotyping platform and prediction method researches about genomic selection for aquaculture

Species	Trait	Genotyping platform	Prediction method	Citation
Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )	parasite resistance	SNP array	GBLUP	Ødegård <i>et al.</i> (2014)
	file color			
	body size	SNP array	GBLUP	Tsai <i>et al.</i> (2015)
Rainbow trout ( <i>Onchorhynchus mykiss</i> )	parasite resistance	SNP array	GBLUP	Tsai <i>et al.</i> (2016)
	disease resistance	SNP array, RAD	ssGBLUP, wssGBLUP, BayesB, BayesC	Vallejo <i>et al.</i> (2016)
Yellow croaker ( <i>Larimichthys crocea</i> )	body size	Genotyping-by-Sequencing	GBLUP, emBayesB	Dong <i>et al.</i> (2106)
	fatty acid composition	(GBS)		
Yesso scallop ( <i>Patinopecten yessoensis</i> )	body size	2d RAD-seq	GBLUP, LASSO, Bayesian LASSO, BayesA, BayesB, rrBLUP	Dou <i>et al.</i> (2016)
Coho salmon ( <i>Onchorhynchus kisutch</i> )	body size	ddRAD-seq	GBLUP	Hosoya <i>et al.</i> (submitted)

# Ograniczenia:

- QTL tej samej cechy mogą u różnych linii czy populacji znajdować się w innych częściach genomu,
- badania prowadzone z zastosowaniem różnych systemów markerowych mogą lokalizować QTL w innych rejonach genomu,
- liczba i lokalizacja wykrytych QTL może być różna w różnych warunkach środowiska,
- sprzężenia marker-cecha mogą być przerwane w wyniku rekombinacji,
- dodatkowo w tym samym regionie genomu mogą być zlokalizowane QTL-e dla różnych cech ilościowych.

# Czy nowoczesne metody sekwencjonowania DNA (NGS) mogą pomóc w prowadzeniu programów selekcyjnych?

1. Umożliwiają uzyskanie wielu markerów genetycznych skorelowanych z genem kodującym wartościową cechę (ilościową) w relatywnie krótkim czasie (genotypowanie przez sekwencjonowanie).
2. Wykorzystanie technik NGS do poszukiwania markerów genetycznych związanych z interesującymi nas cechami ogranicza liczbę **pokoleń** badanych zwierząt.
3. Niestety całkowita liczba osobników, która musi zostać poddana analizie jest duża lub bardzo duża.
4. **Genotypowanie przez sekwencjonowanie** pozwala na dokładniejszą charakterystykę ryb mających brać udział w selekcji.
5. Cena jednej reakcji sekwencjonowania NGS ciągle spada, ale w przypadku przebadania kilkuset lub kilku tysięcy ryb, nadal jest wysoka.



[eit.europa.eu](http://eit.europa.eu)

**Dziękuję bardzo za uwagę!**



EIT Food is supported by the EIT  
a body of the European Union