

ZAŁĄCZNIK 2

dr inż. Remigiusz Panicz

A U T O R E F E R A T
dotyczący działalności naukowo—badawczej

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Szczecin 2017

Spis treści

1. DANE OSOBOWE	3 -
2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE.....	3 -
3. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	4 -
4. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA	5 -
4.2. Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników wskazanego osiągnięcia	6 -
4.2.1. Wstęp.....	6 -
4.2.2. Założenia pracy	13 -
4.2.3. Cel pracy	13 -
4.2.4. Wyniki.....	14 -
4.2.4.1. System antyoksydacyjny oraz markery kondycji lina.....	14 -
4.2.4.2. Opracowanie kalibratorów wewnętrznych do oceny aktywności genów lina .-	17 -
4.2.4.3. Wpływ eksperymentalnych pasz na surowiec mięsny lina.....	19 -
4.2.4.4. Transkryptom jelita lina.....	20 -
4.2.5. Podsumowanie.....	23 -
4.2.6. Piśmiennictwo.....	24 -
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH -	28 -
5.1. Okres przed uzyskaniem stopnia doktora	29 -
5.2. Okres po uzyskaniu stopnia doktora	34 -
5.3. Aplikacyjny charakter prowadzonych badań.....	38 -

1. DANE OSOBOWE

Remigiusz Andrzej Panicz

Katedra Technologii Mięsa, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

71-550 Szczecin, ul. Kazimierza Królewicza 4

e-mail: rpanicz@zut.edu.pl, telefon: 91 449 6664

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- 2010 **Stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych**
Dyscyplina: rybactwo
Specjalność: akwakultura
Nazwa jednostki: Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Technologii Żywności i Rybactwa
Tytuł pracy: „Zastosowanie metody real-time PCR oraz kompetycyjnego testu ELISA do określenia potencjału wzrostowego lina *Tinca tinca* L.”
Promotor: dr hab. inż. Jacek Sadowski, prof. nadzw.
- 2006 **Tytuł magistra inżyniera w zakresie biotechnologia w produkcji zwierzęcej i ochronie środowiska**
Nazwa jednostki: Akademia Rolnicza w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Tytuł pracy: „Poszukiwanie polimorfizmów genu hormonu wzrostu pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) oraz ich ewentualne powiązanie ze wzrostem i masą ciała”
Promotor: dr hab. inż. Wilhelm Grzesiak, prof. nadzw.

3. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

01.03.2015r. – obecnie	Adiunkt Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Katedra Technologii Mięsa
01.10.2014r. – 28.02.2015r.	Starszy wykładowca Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Katedra Technologii Mięsa
01.02.2014r. – 30.06.2014r.	Asystent naukowy Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Zakład Akwakultury
01.07.2011r. – 31.12.2013r.	Asystent naukowy Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Zakład Akwakultury
10.01.2011r. – 30.06.2011r.	Starszy referent techniczny Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Zakład Akwakultury

4. DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA

4.1. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Intensyfikacja hodowli lina (*Tinca tinca* L., 1758) w aspekcie badań nutrigenomicznych

Moim osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, jest cykl pięciu jednotematycznych publikacji:

P1. Drozd R., **Panicz R.**, Jankowiak D., Hofsoe P., Drozd A., Sadowski J. 2014. Antioxidant enzymes in the liver and gills of *Tinca tinca* from various water bodies. Journal of Applied Ichthyology, 30: 2–6. DOI: 10.1111/jai.12420. IF₂₀₁₄ = 0,867; MNiSW = 20, udział 66%

P2. **Panicz R.**, Drozd R., Drozd A., Nędzarek A. 2017. Species and sex-specific variation in antioxidant status of tench (*Tinca tinca*), wels catfish (*Silurus glanis*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) reared in cage culture. Acta Ichthyologica et Piscatoria 47(3): 213–223. DOI: 10.3750/AIEP/02093. IF₂₀₁₆ = 0,670; MNiSW = 20, udział 80%

P3. **Panicz R.** 2016. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis of growth hormone receptor and growth hormone expression in the tench (*Tinca tinca*) fed substituting poultry meal for fish meal. Aquaculture, 465: 179-188. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.09.013. IF₂₀₁₆ = 2,570; MNiSW = 35, udział 100%

P4. **Panicz R.**, Żochowska-Kujawska J., Sadowski J., Sobczak M. 2017. Effect of feeding various levels of poultry by-product meal on the blood parameters, filet composition and structure of female tenches (*Tinca tinca*). Aquaculture Research. DOI: 10.1111/are.13351 IF₂₀₁₆ = 1,461; MniSW = 30, udział 85%

P5. **Panicz R.**, Klopp C., Igielski R., Hofsoe P., Sadowski J., Coller Jr J.A. 2017. Tench (*Tinca tinca*) high-throughput transcriptomics reveal feed dependent gut profiles. Aquaculture, 479: 200-207. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.05.047. IF₂₀₁₆ = 2,570; MNiSW = 35, udział 75%

Jestem autorem koncepcji naukowej wszystkich powyższych publikacji, w jednej pracy jestem jedynym wykonawcą i jedynym autorem, a w pozostałych głównym wykonawcą, który przygotował wszystkie manuskrypty oraz był odpowiedzialny za wartość merytoryczną i cały proces publikowania manuskryptów w czasopiśmie.

Sumaryczny Impact Factor powyższych publikacji według listy Journal Citation Reports za lata 2014 [P1] oraz 2016 [P2, P3, P4, P5] wynosi **8,138**.

Suma punktów za 5 publikacji zgodnie z listą MNiSW za rok opublikowania wynosi **140**. Oświadczenia współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych [P1, P2, P4, P5] wraz z określeniem indywidualnych udziałów wykazano w Załączniku 4.

4.2. Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników wskazanego osiągnięcia

Osiągnięcie obejmuje 5 publikacji przedstawiających badania nad złożoną odpowiedzią organizmu lina na warunki środowiskowe oraz hodowlane, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu pasz komercyjnych oraz doświadczalnych. Prace oceniają wpływ środowiskowych oraz dietozależnych czynników na aktywność enzymatycznych układów antyoksydacyjnych, poziom wybranych markerów biochemicznych, właściwości chemiczne, strukturalne, jak i sensoryczne surowca mięsnego, poziom ekspresji elementów osi somatotropowej oraz profil transkryptomu jelita linów. Każdy z elementów badań zaplanowano tak, aby zgłębić wiedzę o linie oraz dostarczyć danych bądź rozwiązań, które pozwolą odblokować potencjał tego gatunku, a tym samym wpłyną na zrównoważony rozwój słodkowodnej akwakultury.

4.2.1. Wstęp

Zrównoważona akwakultura to obecnie nieunikniony światowy trend, którego źródeł można upatrywać w zwiększonym popycie ludzi, jak i przemysłu, na ryby oraz inne organizmy wodne, w zmianach klimatu oraz sposobie gospodarowania zasobami naturalnymi. W skali światowej, a tym bardziej europejskiej, za najważniejszy czynnik zagrażający rozwojowi akwakultury uznaje się kurczące się naturalne zasoby ryb, które stały się głównie źródłem oleju oraz mączki wykorzystywanych w procesie produkcji pasz. Ten oraz inne towarzyszące czynniki, takie jak brak innowacyjnych narzędzi oraz rozwiązań, niedostateczne wykorzystanie i zarządzanie zasobami naturalnymi sprawiły, iż od 2000 r. europejska produkcja akwakultury utrzymuje się na stałym poziomie. Efektem tego stanu jest rosnąca zależność państw europejskich (EU-28) od importu ryb oraz produktów spożywczych pochodzenia wodnego, która osiągnęła poziom 57% (Bostock i in. 2016). Rozwiązaniem

wskazywanym przez Komisję Europejską jest ekointensyfikacja poprzez przekształcenie liniowego (ang. linear) modelu akwakultury w zamknięty, zwany również okrężnym (ang. circular economy). Jest to proces złożony, który wymaga transdyscyplinarnego podejścia do kwestii związanych z integracją naukowych i technologicznych rozwiązań, stworzenia nowych regulacji prawnych i instrumentów ekonomicznych oraz złagodzenia, a jeśli to możliwe, usunięcia ograniczeń społecznych. Ponieważ ekonomiczno-prawno-społeczne aspekty są w głównej mierze tematem analiz określonych organów administracyjnych, to innowacyjne rozwiązania są domeną współpracujących ze sobą jednostek naukowych i przedsiębiorstw. Kooperacja skupia się głównie wokół działań nad opracowaniem bądź adaptacją istniejących systemów hodowlanych, testowaniem nowych kompozycji paszowych, zastosowaniem najnowszych rozwiązań do analizy znacznych ilości danych oraz dywersyfikacją hodowanych gatunków oraz otrzymywanych produktów akwakultury. Wszystkie kierunki działań muszą dodatkowo uwzględnić wpływ zmian klimatu, które niekoniecznie należy rozważać w kontekście zagrożeń, lecz sprzyjających okoliczności dla rozwoju akwakultury.

W polskiej akwakulturze dominują słodkowodne hodowle karpia (*Cyprinus carpio*) oraz pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*), jednakże takie gatunki jak lin (*Tinca tinca*), sum afrykański (*Clarias gariepinus*) czy sterlet (*Acipenser ruthenus*) znalazły się również w centrum zainteresowania hodowców. Spośród trzech dodatkowych gatunków lin ma najdłuższą historię w rodzimej akwakulturze. Jest to gatunek o znaczącym potencjale dla akwakultury, czego dowodem są liczne badania sięgające początków XX wieku (von Milkau 1921). Ogromne zainteresowanie tym gatunkiem wynika z faktu, iż łączy on w sobie szereg cech, istotnych zarówno dla hodowców, jak i konsumentów. Hodowcy doceniają takie zalety lina jak: wysoka płodność, odporność na choroby wirusowe (często dziesiątkujące hodowle innych karpiovatych - głównie karpia) oraz możliwość hodowli w recyrkulacyjnych systemach akwakultury (RAS), w sadzach bądź tradycyjnych stawach ziemnych (Pimpicka 1991, Winfield i Nelson 1991, Jankowska i in. 2006, Rehbein i Oehlenschlager 2009). Z kolei konsumenci wskazują na wysokie walory smakowe mięsa, niską zawartość tłuszczu w filetach (do 6%), wysoką zawartość ryboflawiny (180 µg/100 g), niacyny (4 mg/100 g) oraz witamin z grupy B (pirydoksyny: 290 µg/100 g, kwasu pantotenowego: 670 µg/100 g), wyższą w porównaniu do mięsa karpia (Rehbein i Oehlenschlager 2009). Wszystkie cechy sugerują, że lin jest idealnym gatunkiem dla akwakultury, jednakże światowa akwakultura uznaje go za gatunek drugorzędny wskazując jako główny powód wolne tempo wzrostu (Wedekind i in. 2003). Von Lukowicz i in. (1986) wykazali, że lin może w trzecim bądź

nawet w czwartym roku osiągnąć masę jednostkową 250 g. Autorzy przytaczają również informacje o rezultatach selekcji lina z Quolsdorf (Saksonia, Niemcy) w kierunku szybszych przyrostów, które wskazują, iż lin może osiągnąć masę jednostkową 250 g w drugim roku, natomiast w trzecim już 800 g (von Milkau 1921). Są to jedyne dane literaturowe dokumentujące tak szybkie tempo wzrostu lina. Pod koniec XX wieku zainteresowanie linem ponownie wzrosło, czego efektem są liczne doświadczenia oceniające wpływ technik żywienia oraz różnorodnych diet na przeżywalność i tempo wzrostu lina prowadzone głównie przez polskie, ale także i hiszpańskie, niemieckie oraz czeskie ośrodki badawcze. Uzyskane wyniki wzbogaciły stan wiedzy o informacji dowodzące, że larwy solowca (*Artemia salina*) są najlepszym pokarmem dla wzrostu i rozwoju wylęgu lina (Wolnicki i Korwin-Kossakowski 1993), a dłuższe podawanie pokarmu naturalnego determinuje wyższe przyrosty ryb (Wolnicki i Górny 1995). Doświadczenia dotyczące żywienia wylęgu lina wykazały ograniczoną możliwość stosowania kombinacji pożywienia naturalnego i sztucznego (Wolnicki i Myszkowski 1998) oraz określiły ciągły sposób karmienia za optymalny dla tego gatunku (Wolnicki i in. 2003). Stwierdzono ponadto, że wylęg lina preferuje pokarm o małych rozmiarach ze względu na specyficzną budowę otworu gębowego (Quirós i Alvariño 2000) Autorzy prac są zgodni w kwestiach żywienia larw lina pokarmem naturalnym oraz konieczności opracowania dedykowanej mieszanki paszowej dla późniejszych stadiów lina, gdyż wzrost lina o 0,66 mm na dzień jest zbyt wolny w porównaniu do innych gatunków. Kolejne badania wykazały, iż żywienie młodocianych linów szeregiem komercyjnych mieszanek paszowych przeznaczonych dla ryb słodkowodnych, jak i morskich, mogą powodować deformacje kośćca, kręgosłupa w odcinku ogonowym (Quirós i in. 2003). Prób zmierzających do zoptymalizowania biotechniki chowu lina podjęli się czescy badacze (Flajshans i Linhart 2000, Buchtova i in. 2003, Flajshans i in. 2004, Linhart i in. 2006), skupiając się na metodach produkcji osobników triploidalnych bądź tetraploidalnych, które w efekcie miały charakteryzować się szybszymi przyrostami kosztem niedorozwiniętych gonad. Zmiany liczby chromosomów ostatecznie nie doprowadziły do skrócenia cyklu produkcyjnego, a autorzy wskazali użyteczność swej metody głównie w kierunku selekcji samic w wieku 3+, bądź starszych. Inne badania (m.in. w oparciu o DNA) pozwoliły scharakteryzować populacje oraz linie hodowlane lina, dostarczając informacji o zasobach i zróżnicowaniu genetycznych tego gatunku (Rennert i in. 2003, Kohlmann i in. 2009, Panicz i in. 2012).

Wszystkie dotychczasowe przedsięwzięcia badawcze znacząco wzbogaciły wiedzę z zakresu biologii, technik chowu czy też zróżnicowania genetycznego lina. Jednakże

środowisko naukowe końca pierwszej dekady XXI wieku dostrzegło konieczność prowadzenia interdyscyplinarnych badań, szczególnie takich, które łączą doświadczenia żywieniowe z analizami z zakresu histologii (Ostaszewska i in. 2006) oraz fizjologii (Zakęś i in. 2006, Sikorska i Wolnicki 2010). Akwakultura światowa dostrzegła również potencjał aplikacyjny badań oceniających wpływ warunków hodowli na poziom stresu oksydacyjnego, zjawiska, definiowanego jako czasowe bądź chroniczne podwyższenie stężenia reaktywnych form tlenu (ROS), które zmieniają podstawowy metabolizm komórki oraz mogą nieodwracalnie uszkadzać jej struktury (Lushchak, 2011). W regulację zawartości ROS zaangażowane są głównie enzymy antyoksydacyjne takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx) oraz pośrednio reduktaza glutationowa (GR), S-transferaza glutationowa (GST), dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (G6PD), (Livingstone 2003, Halliwell i Gutteridge 2007). Liczne badania wykazały, że monitoring aktywności tych czynników jest kluczowym elementem w procesie optymalizacji procesu hodowli ryb, gdyż zjawisko stresu oksydacyjnego obserwowane u ryb hodowlanych może być efektem synergistycznego wpływu czynników środowiska wodnego. Najczęściej opisywane są nagłe zmiany temperatury wody (Vinagre i in. 2012), niewłaściwie zbilansowana dieta (Enes i in. 2012), bądź obecność niektórych składników chemicznych w systemach hodowlanych (Tkachenko i in. 2013). W literaturze naukowej nie odnaleziono informacji, które opisywałyby wpływ czynników hodowlanych, tj.: środowiska bytowania, systemów hodowlanych bądź samej kwestii żywienia na poziom stresu oksydacyjnego u tego gatunku. W przypadku lina, który preferuje nocny tryb życia, znosi warunki niskiego natlenienia wody oraz jest rybą spokojnego żeru, intensyfikacja jego hodowli powinna być oparta na wynikach opisujących drogi powstawania oraz dynamikę zmian stresu oksydacyjnego.

Istotną kwestią akwakultury przyszłości jest zapewnienie hodowanym gatunkom zoptymalizowanych mieszanek paszowych, które nie będą uzależnione głównie od dostępności na rynku ryb, mączki i olejów rybnych, z których produkuje się pasze. Szczególnie w sytuacji, gdy różne sektory gospodarki mocno współzawodniczą o kurczące się zasoby ryb dziko żyjących. W obecnej dekadzie, znacznie bardziej niż w latach wcześniejszych, szybka ocena wpływu nowych składników pasz na organizm ryb oraz parametry hodowlane, a przede wszystkim na opłacalność całej produkcji, jest kluczowa. Aby osiągnąć ten cel prowadzone są liczne doświadczenia żywieniowe, w których mączka rybna (droga i coraz trudniej dostępna) jest zastępowana w paszach przez komponenty roślinne bądź zwierzęce produkty uboczne. Badania przeprowadzone przez González-Rodríguez wraz

z zespołem (2014, 2015) dowiodły, że mączkę rybną można częściowo zastąpić przez mączkę drobiową bądź koncentrat z białek groszku bez wpływu na długość całkowitą, masę oraz przyrosty dobowe ryb. Wyniki tych badań mają szczególne znaczenie dla Polski, która jako lider produkcji drobiarskiej w Europie (2.84 Mt w 2015 r.) ma do zagospodarowania znaczne ilości powstających produktów ubocznych z tego sektora (GUS 2016). Mączka wytworzona z takiego materiału jest bogatym źródłem białka zwierzęcego i nie zawiera roślinnych składników antyodżywczych (np. inhibitory proteaz, saponiny, alkaloidy, estry forbolu) bądź też takich, które nie ulegają trawieniu (polisacharydy nieskrobiowe), a które powszechnie występują w komponentach pasz pozyskiwanych przykładowo z soi, kukurydzy bądź ryżu (Santigosa i in. 2011, Troell i in. 2014). Utrzymanie odpowiedniego tempa wzrostu ryb żywionych nowymi mieszankami paszowymi to istotny aspekt, który nie może jednak ograniczać akceptowalności surowca rybnego przez konsumentów. Ostatecznie to konsument *de facto* decyduje o przydatności stosowania paszy, oceniając surowiec jako pochodną procesów biochemicznych zachodzących w organizmie ryby na skutek zastosowanego programu żywieniowego. Co interesujące, konsekwencją stosowania eksperymentalnych pasz jest zmiana nie tylko w wydajności rzeźnej, ale także w teksturze oraz strukturze tkanki mięśniowej (Jankowska i in. 2006, Cheng i in. 2014). Liczne badania żywieniowe przeprowadzone dla łososia atlantyckiego wykazały, że żywienie mączką drobiową miało istotny wpływ na strukturę oraz przydatność technologiczną filetów, jak również na poziom akceptacji konsumentów (Hatlen i in. 2014). Natomiast doświadczenia na innej rybie łososiowatej, pstrągu tęczowym, dostarczyły kolejnych danych o tym jak znaczący wpływ ma skład paszy w kształtowaniu właściwości sensorycznych filetów (De Francesco i in. 2004). W przypadku lina dostępne są nieliczne informacje obrazujące wpływ pasz na właściwości sensoryczne filetów. Turchini i in. (2007), wykazali w swych badaniach, że dodatek oleju roślinnego do pasz przyczynia się do pogorszenia właściwości sensorycznych filetów, co było spowodowane podwyższonym poziomem lotnych cząsteczek aldehydów oraz alkoholi, powstałych w procesie oksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie n-3 i n-6. W aspekcie polskiego przemysłu drobiarskiego, który dostarcza produktów ubocznych na poziomie około 30%, słusznym kierunkiem staje się przeprowadzenie kompleksowych badań oceniających wpływ eksperymentalnych pasz na bazie drobiowych produktów ubocznych na organizm lina (Sams 2001). Badania te powinny obejmować analizę składu podstawowego pasz oraz filetów ryb, jak również ocenę poziomu wskaźników biochemicznych potencjalnie zależnych od procentowego udziału składnika pokarmowego, który różnicuje testowane pasze. Dodatkowo badania powinny ocenić czy struktura filetów

jest zależna od skarmianych pasz oraz czy mają one wpływ na właściwości sensoryczne filetów. Takie multidyscyplinarne podejście badawcze dostarczyłoby pełnego obrazu dla postawionych hipotez badawczych, co jest niezmiernie istotne dla badań o aplikacyjnym charakterze.

Innym kierunkiem badawczym, który w przypadku lina nie został szczegółowo rozpoznany jest problem analizy ekspresji genów, szczególnie tych, które kodują białka odpowiedzialne za procesy trawienia, wchłaniania oraz przyswajania składników pokarmowych. Brak informacji w tym zakresie zapewne wynikał z niedostatecznej ilości informacji na temat genów metabolizmu podstawowego, które pełnią rolę wewnętrznego kalibratora w reakcjach real-time PCR. Jeden, a najlepiej kilka takich genów powinny charakteryzować się jak najniższym, a co najważniejsze stabilnym poziomem ekspresji, gdyż jest to kluczowe dla precyzji oznaczeń, a tym samym warunkuje uzyskanie wiarygodnych wyników. Wytypowanie takiego markera, a następnie przeprowadzenie doświadczenia żywieniowego połączonego z analizą ekspresji genów kodujących białka osi somatotropowej bądź też enzymy zaangażowane w proces trawienia, niejednokrotnie przyczyniło się do zoptymalizowania programów żywieniowych dla wielu gatunków ryb (De Santis i in. 2009, Hagn i in. 2009, Gu i in. 2014). Ocena ekspresji genów to trend badań, który stale towarzyszy akwakulturze, szczególnie w kontekście jej zrównoważonego rozwoju. W akwakulturze oprócz gatunków hodowanych na masową skalę (łosoś atlantycki, *Salmo salar*; pstrąg tęczowy, *Oncorhynchus mykiss*; labraks, *Dicentrarchus labrax*; dorada, *Sparus aurata*), ważne są również te pozwalające zdywersyfikować i zintensyfikować produkcję światowej akwakultury, takie jak wrakoń (*Polyprion americanus*), halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), sandacz (*Stizostedion lucioperca*) czy też omawiany w niniejszym opracowaniu lin (Mylonas i Robles, 2014).

Wszystkie powyższe kierunki usprawnienia akwakultury lina są istotne zarówno dla koncernów paszowych, producentów, jak i potencjalnych odbiorców wytworzonego surowca. Jednakże już obecnie widoczny jest, a w najbliższych latach będzie jeszcze bardziej znaczący, trend badawczy w kierunku wykorzystania wysokoprzepustowych technik analitycznych z grupy „omik” (Martin i Król 2017). Zastosowanie techniki real-time PCR pozwala na oszacowanie w jednej próbie poziomu ekspresji dla kilku genów jednocześnie, co jest niewątpliwie zaletą tej techniki. Natomiast, jeśli istnieje możliwość określenia całego profilu transkryptomycznego w badanej próbce, technika ta nie jest już tak atrakcyjna. Transkryptomika, bo o tej technice tu mowa, zrewolucjonizowała współczesne podejście do wielu dyscyplin badawczych, gdyż oprócz wysokiej jakości izolatu mRNA nie wymaga

wcześniejszej wiedzy (np. o sekwencji starterów PCR), aby ukazać poziom aktywności genów w danej próbie. Dzięki temu prowadząc doświadczenie żywieniowe możemy z łatwością zidentyfikować geny, które w porównaniu do kontroli bądź innych wariantów badawczych wykazują obniżony lub podwyższony poziom aktywności. Zebrane informacje pozwolą na wskazanie, jaki wpływ miała testowana pasza na dany organizm, a jeśli zidentyfikujemy kilka interesujących nas genów, możemy rutynowo oceniać ich poziom ekspresji za pomocą techniki real-time PCR. W przypadku doświadczeń żywieniowych testujących przyswajalność pasz przez lina, szczególnie użyteczną bazą aktywności genów byłaby ta opracowana na podstawie prób jelita. Informacje o poziomach aktywności genów w przewodzie pokarmowym zobrazowałyby, jak przebiega proces rozkładu, wchłaniania oraz transportu składników pokarmowych na poziomie molekularnym. Takie zasoby danych są już dostępne dla wielu hodowlanych i dzikich gatunków ryb, u których w ten sposób monitorowane są procesy związane z odpowiedziami komórek jelita na eksperymentalne mieszanki paszowe (Król i in. 2016), z rozwojem procesów immunologicznych (Martin i in. 2016), zainicjowaniem procesów trawienia u larw (Hsu i in. 2015) lub specjalizacją komórek wyściełających ściany jelita (Calduch-Giner i in. 2016).

Rozwój akwakultury lina przechodzi okresowo fazy wzrostu oraz spadku zainteresowania. Jest to nieodłącznie związane z dostępnością nowych technik hodowlanych, badawczych bądź też innych, które mogą być pośrednio związane z tym zagadnieniem. Zapewne intensyfikacja produkcji lina musi być poprzedzona kolejnymi multidyscyplinarnymi badaniami, które gruntownie scharakteryzują fizjologiczną oraz molekularną naturę lina, a w szczególności jak ten perspektywiczny dla słodkowodnej akwakultury gatunek reaguje na stymulanty pochodzące z otaczającej go hodowli. Przykładowo znajomość mechanizmów odpowiedzialnych za deformacje szkieletu pozwoliłaby zoptymalizować warunki hodowli, a tym samym w przyszłości zwiększyć produkcję lina.

4.2.2. Założenia pracy

W pracy postawiono następujące tezy:

1. Aktywność systemu antyoksydacyjnego lina jest zależna od środowiska bytowania, a jej monitoring może obrazować poziom stresu oksydacyjnego w organizmie ryby.
2. Żywienie lina komercyjnymi paszami przeznaczonymi do żywienia innych karpiowatych prowadzi do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu systemu antyoksydacyjnego.
3. Geny kodujące białka rybosomalne są dobrym kalibratorem do monitoringu poziomu ekspresji genów lina.
4. Wprowadzenie mączki drobiowej do produkcji pasz ma istotny wpływ na cechy surowca mięsnego lina.
5. Ocena transkryptomu jelita lina dostarcza pełnego obrazu o procesach zachodzących w tym organie pod wpływem eksperymentalnych mieszanek paszowych.
6. Baza transkryptomu lina dostarcza nieograniczonych możliwości do monitorowania procesów molekularnych podczas doskonalenia akwakultury lina.

4.2.3. Cel pracy

Lin jako perspektywiczny gatunek dla zrównoważonego rozwoju słodkowodnej akwakultury stanowi wymagający, a co za tym idzie interesujący obiekt do badań. Jednakże intensyfikacja produkcji tego gatunku wymaga kolejnych, rozbudowanych i co najważniejsze multidyscyplinarnych badań. Dlatego też główne cele pracy obejmują: (i) ocenę funkcjonowania systemu antyoksydacyjnego lina w kontekście monitorowania poziomu stresu indukowanego warunkami środowiskowymi oraz żywieniem, (ii) charakterystykę molekularną oraz selekcję wewnętrznych kalibratorów (genów) kluczowych w ocenie poziomu ekspresji genów lina, (iii) przetestowanie wpływu paszy na bazie mączki drobiowej na cechy morfologiczne, parametry biochemiczne krwi oraz właściwości technologiczne surowca mięsnego lina, (iv) stworzenie bazy transkryptów ulegających ekspresji w jelicie lina oraz wskazanie dietozależnych genów, których zróżnicowany poziom ekspresji dokładnie obrazuje wpływ żywienia na funkcjonowanie tego organu.

4.2.4. Wyniki

4.2.4.1. System antyoksydacyjny oraz markery kondycji lina

Układ antyoksydacyjny to swoista bariera ograniczająca negatywny wpływ wolnych rodników oraz reaktywnych form tlenu na funkcjonowanie organizmu. Pomiar aktywności bądź stężenia enzymów antyoksydacyjnych oraz drobnocząsteczkowych antyoksydantów, które tworzą ten system obronny, dostarcza informacji o poziomie stresu oksydacyjnego, czyli o braku równowagi pomiędzy powstawaniem wolnych rodników a ich usuwaniem. W pracy [P1] wykazałem i opisałem po raz pierwszy stan, w którym aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx), katalazy (CAT) oraz transferazy glutationowej (GST) w wątrobie oraz skrzelach zależą od typu środowiska bytowania lina. Najwyższy poziom aktywności enzymów oznaczono w próbach linów odłowionych z estuarium Odry, natomiast znacząco niższe i na porównywalnym poziomie w próbach linów ze stawów hodowlanych w Malińcu oraz z hodowli sadzowej Rybackiej Stacji Doświadczalnej w Nowym Czarnowie (RSD). Estuarium Odry to wody bardzo żyzne, przestronne i głębokie. W takich warunkach lin znajduje doskonałe warunki do bytowania ze względu na bogactwo fauny dennej i dogodne warunki termiczne. Jednakże wskazywany w pracy prooksydacyjny wpływ estuarium Odry wynika prawdopodobnie z obecności zanieczyszczeń o różnorodnym pochodzeniu. Wody tego regionu charakteryzują się niskim spadkiem, co sprzyja kumulacji zanieczyszczeń pochodzących z górnych partii rzeki. Również Morze Bałtyckie wypycha słonawe masy wód, które niosą także zanieczyszczenia pochodzące z aglomeracji Szczecina. Sytuacja taka sprawia, że na przestrzeni roku wielokrotnie dochodzi do wymiany mas wody w tym regionie, a miękkie i muliste dno wiąże zanieczyszczenia (Wolska i Namieśnik 2002, Wolska i in. 2003). Takie warunki bytowania sprawiają, że lin żywiąc się hydrobiontami dennymi może kumulować znajdujące się w estuarium Odry zanieczyszczenia. Wody w estuarium Odry w okresie letnim cechują duże wahania temperatury, a towarzyszące im wahania poziomu tlenu mogą potęgować odpowiedź ze strony układu antyoksydacyjnego (Ross i in. 2001). Analizując wyniki badań linów pozyskanych z hodowli stawowej w Malińcu oraz z sadzy RSD, z łatwością możemy stwierdzić znacznie niższy poziom aktywności SOD, GPx, CAT oraz GST w porównaniu do ryb z estuarium Odry. W przypadku linów bytujących w stawach brak podwyższonego poziomu aktywności enzymów wynika z optymalnych warunków hodowlanych oraz wysokiej jakości środowiska objętego programem ochrony Natura 2000. Interesujących wyników dostarczyły również analizy prób linów z hodowli sadzowej RSD, gdzie intensywny typ

hodowli z ograniczonym dostępem ryb do dna oraz żywniem gotowymi mieszankami paszowymi miał podobny wpływ na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, jak w przypadku hodowli stawowej. System sadzy RSD umieszczony jest w kanale wody pochłodniczej elektrowni Dolna Odra, zasilanej wodami pobieranymi ze sztucznego kanału wykopanego poprzecznie do Regalicy (Odry Wschodniej). Względem pierwszej z opisywanych lokalizacji, RSD umieszczona jest w odległości około 20 km w górę Odry, zatem także może być narażona na zanieczyszczenia niesione przez spływające wody zlewni tej rzeki. Jednakże analiza głównych elementów hodowli sugeruje, że na niższy poziom aktywności SOD, GPx, CAT oraz GST mogły mieć wpływ ograniczony dostęp do pokarmu naturalnego, szybki przepływ wody przez sadze z linami oraz antyoksydanty (np. witamina C) znajdujące się w skarmianej mieszance [P1]. Interesujący jest również fakt, iż poziom aktywności analizowanych enzymów antyoksydacyjnych był zawsze wyższy w wątrobie niż w skrzelach linów [P1]. Wynika to z faktu, iż głównie w wątrobie, ale także i w mózgu oraz nerkach ryb, zachodzą intensywnie przemiany tlenowe, czego efektem jest zwiększony poziom ROS, a przez to rozbudowane systemy antyoksydacyjne. W przypadku skrzeli niższy poziom aktywności analizowanych enzymów wynika ze zdolności karpiowatych do usuwania niektórych form ROS (H_2O_2), etanolu czy też CO_2 w procesie dyfuzji przez skrzela (Wilhelm-Filho i in. 1994, Lushchak i Bagnyukova 2006). Wyniki uzyskane w niniejszych badaniach są zgodne z tymi uzyskanymi dla innych gatunków, takich jak pstrąg tęczy czy też jesiotr adriatycki (*Acipenser naccarii*), (Trenzado i in. 2006). Reasumując, charakter środowiska bytowania oraz wszystkie czynniki go kształtujące mają istotne znaczenie dla sposobu oraz natężenia reakcji antyoksydacyjnych u lina.

W zróżnicowanym środowisku wodnym możemy z łatwością wyróżnić osobniki o wąskiej bądź szerokiej tolerancji na czynniki środowiskowe (np. stenotermiczne). Lin jako gatunek eurytermiczny, preferujący płytkie zbiorniki o podwyższonej termice, jest interesującym obiektem badań oraz gatunkiem o dużym potencjale dla słodkowodnej akwakultury. Zdolność tego gatunku do bytowania w zmiennych warunkach może sugerować, że może być on zaadoptowany do intensywnych warunków hodowli w systemie sadzowym. Jak sugerują moje badania, pomiar aktywności enzymów antyoksydacyjnych to właściwa droga do monitorowania funkcjonowania organizmu lina [P1]. Jednakże pobór prób z organów wewnętrznych, bądź też fragmentów skrzeli, nie może stać się rutynowym sposobem umożliwiającym ocenę aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Dlatego też, w kolejnej pracy [P2] wskazuję na użyteczność oceny poziomu aktywności enzymów SOD, GPx, CAT oraz GST, jak również całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (FRAP),

markerów funkcjonowania wątroby (transaminaza alaninowa, ALT oraz transaminaza asparaginowa, AST), markera funkcjonowania mięśnia sercowego (dehydrogenaza mleczanowa, LDH) oraz markerów stanu odżywienia (albumina, bilirubina, kwas moczowy) na podstawie prób krwi. Aby zobrazować jak wyżej wymienione elementy kształtują się na tle innych gatunków, do analiz porównawczych włączono również dwa inne gatunki należące do innych rodzin, tj. suma afrykańskiego oraz sterleta. Wyniki ukazały, że lin w stosunku do pozostałych dwóch gatunków wykazuje znacząco wyższą aktywność FRAP, GPx, CAT oraz GST, co można by interpretować jako zwiększoną produkcję ROS oraz zaktywizowanie systemu antyoksydacyjnego. Jednakże, jeśli przyjrzymy się gałęzi ewolucji ichtiofauny, możemy stwierdzić, iż u przedstawiciela jesiotrowatych poziom aktywności tych elementów jest znacząco niższy aniżeli u znacznie młodszego ewolucyjnie lina, przedstawiciela karpiowatych. Podobny fenomen został opisany przez Rudneva (1997), co zostało wyjaśnione jako wynik niższego zapotrzebowania gatunków starszych ewolucyjnie na tlen. Niemniej jednak największa różnica pomiędzy wynikami uzyskanymi dla badanych gatunków widoczna jest dla pary lin i sterlet (FRAP, GPx, CAT, GST, LDH, ALT, bilirubina, kwas moczowy), następnie sterlet i sum (FRAP, GST, LDH, AST, bilirubina, kwas moczowy) oraz lin i sum (FRAP, GPx, GST, AST, kwas moczowy), [P2]. Oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz poziomów markerów biochemicznych we krwi tych trzech gatunków stanowi swojego rodzaju punkt odniesienia dla dalszych praktyk hodowlanych. Wyniki uzyskane w ramach tej pracy rzucają również światło na kwestię reakcji poszczególnych gatunków ryb na podawaną paszę, jeden z najważniejszych elementów hodowli. Jednakże według autora niniejszego opracowania trudno jest jednoznacznie określić wpływ zastosowanych pasz na oceniane we krwi parametry. Aby tego dokonać niezbędne będą kolejne doświadczenia, łączące testy żywieniowe na bazie eksperymentalnych pasz z technikami histologicznymi, biochemicznymi oraz molekularnymi. Interesującym wynikiem pracy [P2] jest pokazanie odmiennej reakcji samic i samców na zastosowany układ doświadczalny. Najwięcej różnic pomiędzy płciami w poziomach badanych składników odnotowano dla lina (FRAP, GPx, albumina, kwas moczowy), następnie suma (SOD, albumina, bilirubina), a najmniej dla sterleta (ALA). W 6 na 8 przypadków poziom badanych wskaźników był wyższy u samic, co w przypadku lina mogło zależeć od procesów związanych z formowaniem się gonad u samic, będących w momencie doświadczenia w wieku 2+. Wyniki te dodatkowo potwierdzają jak skomplikowaną kwestią jest sposób hodowli, a szczególnie dobór pasz w odniesieniu do kształtowania się cech płciowych, zależnych od sumarycznej aktywności wielu elementów szlaków metabolicznych.

Porównując poziomy aktywności SOD, GPx, CAT oraz GST w próbach z obu grup linów hodowanych w sadszach [P1, P2], można dostrzec, iż wyniki uzyskane na bazie prób krwi [P2] plasują się pomiędzy wynikami otrzymanymi na podstawie prób wątroby oraz skrzeli [P1]. Jedynie w przypadku GST poziom we krwi był ponad dwudziestokrotnie wyższy w próbach krwi [P2] aniżeli wątrobie [P1].

4.2.4.2. Opracowanie kalibratorów wewnętrznych do oceny aktywności genów lina

Ocena aktywności genów to kolejny ze sposobów charakteryzowania procesów zachodzących w organizmie pod wpływem różnych stymulantów. Warunkiem przeprowadzenia takiej oceny jest każdorazowe wytypowanie wewnętrznych kalibratorów, czyli genów o niskim i niezmiennym poziomie ekspresji. W przypadku lina nie podjęto skutecznej próby zidentyfikowania takiego genu (takich genów). Temu zagadnieniu poświęcona była kolejna praca [P3]. W celu przeprowadzania procedury wytypowania oraz przetestowania użyteczności genów referencyjnych przeprowadzono doświadczenie żywieniowe, w którym dwie grupy samic linów były karmione eksperymentalnymi mieszankami paszowymi, z których jedna została przygotowana z użyciem mączki rybnej (FM), druga natomiast w oparciu o mączkę uzyskaną z produktów ubocznych przemysłu drobiarskiego (PBM). Na podstawie wstępnych analiz molekularnych uzyskano fragmenty sekwencji siedmiu potencjalnych genów referencyjnych lina, tj. kodujących dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego, *gapdh* (852 pz, GenBank KX082698), β-aktynę, *actb* (528 pz, GenBank KX082699), czynnik elongacyjny 1a, *ef-1a* (455 pz, GenBank KX082697), białko rybosomalne 18, *rpl8* (668 pz, GenBank KX082694), białko rybosomalne s11, *rps11* (363 pz, GenBank KX082695), α-tubulinę, *tuba* (144 pz, GenBank KX082693) oraz cząsteczkę 18S rybosomowego RNA, 18S rRNA (433 pz, GenBank KX082696). Następnie zaprojektowano docelowe sekwencje starterowe oraz za pomocą techniki RT-PCR potwierdzono ich specyficzność uzyskując amplikony o oczekiwanych wielkościach (18S rRNA – 129 pz, *gapdh* – 128 pz, *ef-1a* – 103 pz, *rpl8* – 127 pz, *rps11* – 102 pz, *actb* – 114 pz, *tuba* – 144 pz). Ocenę stabilności aktywności genów referencyjnych przeprowadzono techniką real-time PCR w oparciu o matryce RNA wyizolowane z fragmentów jelit, wątrób, śledzion, mięśni oraz nerek samic linów po zakończeniu doświadczenia żywieniowego. Uzyskane wartości Cp (crossing point) przeanalizowano w oparciu o algorytmy programów geNorm oraz NormFinder, dzięki czemu wytypowano *rps11* oraz *rpl8*, jako dwa pierwsze geny referencyjne dla gatunku lina. Użyteczność tych genów potwierdzono oceniając wpływ żywienia paszami FM i PBM na poziom ekspresji genów kodujących hormon wzrostu (*gh*)

oraz receptor hormonu wzrostu (*ghr*) - dwa kluczowe elementy osi somatotropowej, która odgrywa ważną rolę w kontroli regulacji metabolizmu i procesów fizjologicznych. Sekwencje regionów docelowych oraz starterów niezbędne do oceny aktywności *ghr* opracowano w ramach niniejszej pracy, natomiast do oceny ekspresji *gh* - w oparciu o rezultaty innych badań własnych (Panicz i in. 2015). Uzyskane wyniki potwierdziły, że geny referencyjne zostały wybrane poprawnie, co było widoczne w ich stałym poziomie ekspresji we wszystkich badanych próbach (5 organów x 2 warianty żywieniowe x 5 ryb x 2 powtórzenia). Analiza pokazała również, że ekspresja genów *gh* oraz *ghr* nie jest generalnie wrażliwa na żywienie samic linów paszami różniących się typem mączki (FM lub PBM). Na podstawie tych badań stwierdzono, że do oceny wpływu żywienia paszami FM lub PBM na organizm samic linów niezbędne jest inne podejście. Takie, które pozwoli ocenić zmienność ekspresji genów w poszczególnych szlakach metabolicznych odpowiedzialnych za przemianę białek, tłuszczów bądź innych komponentów pasz, albo całkowicie nowatorskie, które kompleksowo oceni poziom aktywności genów w badanej próbce (np. sekwencjonowanie kolejnej generacji transkryptów).

W pracy [P3] zaprezentowano również inne interesujące i wartościowe wyniki, wpisujące się w stale żywą dyskusję dotyczącą pozycji systematycznej tego gatunku. Z pragmatycznego punktu widzenia, ważne w optymalizacji biotechniki chowu lina są także informacje wskazujące, który z gatunków ryb karpiowatych jest najbliższy ewolucyjnie linowi. Gatunki, które ewoluowały obok siebie i mają w niedalekiej przeszłości wspólnego przodka, cechują się wysokim podobieństwem genetycznym, co bezsprzecznie przekłada się na sposób funkcjonowania organizmu. Pozwoli to wykorzystać w pracach poświęconych linowi informacje dotyczące pokrewnych gatunków, które zostały już gruntownie scharakteryzowane i wprowadzone do akwakultury. Wcześniejsze rezultaty badań własnych (Panicz i in. 2012) pozwoliły stwierdzić, że lin jest bliższy filogenetycznie przedstawicielom ryb karpiowatych z Azji. Wyniki niniejszej pracy [P3] potwierdziły na podstawie porównań opracowanych sekwencji aminokwasowych *rpl8*, *rps11* oraz *ghr* z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank, że lin jest najbliższy filogenetycznie leszczowi chińskiemu (*Megalobrama amblycephala*). Jest to gatunek intensywnie hodowany od 1961 r. w Chinach, który posiada identyczną liczbę chromosomów ($2n = 48$) jak lin oraz, z którym jak donoszą Zou i in. (2007), lin tworzy hybrydy o różnym poziomie ploidalności.

4.2.4.3. Wpływ eksperymentalnych pasz na surowiec mięsny lina

Poprawa biotechniki chowu lina oraz możliwości zagospodarowania PBM (mączka z drobiowych produktów ubocznych), w aspekcie malejącej podaży FM (mączka rybna) i FO (oleju rybnego) na rynku pasz dla zwierząt stały się głównymi przesłankami wyboru kolejnego problemu badawczego. Celem nadrzędnym kolejnej pracy [P4] była wielowątkowa charakterystyka jakości surowca mięsnego samic lina w wieku 2+ (325 ± 18 g). Dodatkowym celem pracy była także ocena wpływu zastosowania eksperymentalnych pasz o różnym poziomie podmiany (0; 25,7; 48,6; 71,4 oraz 100%) FM przez PBM na wskaźniki biochemiczne we krwi linów oraz na ich kondycję. Wyniki analizy chemicznej filetów ukazały, iż zastosowane kompozycje paszowe miały umiarkowany wpływ na poziom tłuszczu oraz suchej masy w badanych próbach. W filetach ryb karmionych paszą zawierającą 170 g PBM było statystycznie istotnie więcej ($4,70 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) tłuszczu, aniżeli w filetach ryb ($3,33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) karmionych karmą z 25,7% udziałem PBM. W przypadku suchej masy najmniejszy jej udział odnotowano w filetach linów na początku doświadczenia ($23,58 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) i był on statystycznie istotnie mniejszy niż w pozostałych wariantach doświadczenia. Istotny wpływ podawania eksperymentalnych pasz odzwierciedlały zmiany w profilach kwasów tłuszczowych filetów, gdzie wraz ze wzrostem udziału PBM w skarmianych paszach zwiększał się udział nasyconych (SFA) i jednonienasyconych (MUFA) kwasów tłuszczowych. Największy wpływ na wzrost tych frakcji miały odpowiednio kwas palmitynowy (C16:0) oraz kwas oleinowy (C18:1n-9c). Tej tendencji towarzyszył również odwrotny trend dotyczący zmniejszającego się udziału wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w filetach linów i w szczególności dotyczył on kwasów α -linolenowego (C18:3n-3) oraz dokozaheksaenowego (C22:6n-3). Zmiany w profilach kwasów tłuszczowych wywarły również swój wpływ na stosunek kwasów tłuszczowych $\Sigma n-3/\Sigma n-6$, który zmniejszał w filetach ryb karmionych paszami o rosnącym udziale PBM.

Interesującym aspektem pracy są również wyniki pokazujące, że rosnący udział PBM w paszy (0% \rightarrow 24,7% \rightarrow 48,6% \rightarrow 71,4%) koreluje z coraz lepszymi wyniki oceny sensorycznej filetów (2,83 \rightarrow 3,00 \rightarrow 3,33 \rightarrow 3,83) przeprowadzonej przez panel ekspertów. Jedynie całkowita podmiana FM przez PBM w paszach prowadziła do uzyskania najniższych not (2,5) w ogólnej ocenie sensorycznej filetów linów, co najprawdopodobniej wynikało z całkowitego wykluczenia FM z podawanej tym rybam kompozycji paszowej. Wyniki analizy sensorycznej zaprezentowane w pracy [P4] są pierwszymi tego typu dla lina oraz jednymi z nielicznych, które oceniają wpływ karmienia ryb mieszankami paszowymi o różnym stopniu podmiany FM innymi komponentami. Ocena jakości filetów linów

obejmowała również pomiar elementów struktury ich tkanki mięśniowej. Wraz ze zwiększającym się poziomem wymiany obserwowano wzrost zawartości tłuszczu śródmięśniowego. Pomiedzy badanymi grupami ryb stwierdzono istotne statystycznie różnice w powierzchni tłuszczu śródmięśniowego, choć analiza chemiczna filetów nie wykazała istotnych różnic w zawartości tego składnika. Powyższe obserwacje mogą wskazywać na różne szlaki metabolizmu tłuszczu w mięśniach linów w zależności od jakości komponentów wchodzących w skład podawanej rydom mieszanki paszowej. Warty uwagi jest również fakt, iż obraz zewnętrzny wątrób ryb karmionych obiema paszami różnił się znacząco. W przypadku ryb, którym podawano PBM wątroby miały blade kolor, były miękkie w dotyku oraz nosiły ślady toczących się procesów zapalnych. Objawów takich nie stwierdzono w przypadku wątrób linów karmionych paszą na bazie mączki rybnej.

Podobnie jak w przypadku braku różnic w aktywności genów tworzących oś somatotropową [P3], taki i w przypadku ocenianych w pracy [P4] parametrów biochemicznych (glukoza, transaminaza alaninowa i asparaginowa, kinaza kreatynowa, cholesterol, lipoproteiny HDL i LDL, triacyloglicerole, kortyzol oraz bilirubina) nie stwierdzono wpływu eksperymentalnych pasz. Rodzaj paszy nie miał także wpływu na oceniane wyznaczniki kondycji linów, tj. długość i masę ryb oraz trzy wskaźniki, trzewiosomatyczny (VSI), gonadosomatyczny (GSI) i hepatosomatyczny (HSI). Konfrontując niniejsze wyniki z tymi dostępnymi w innych opracowaniach naukowych uznać można, że wpływ żywienia jest mniej zauważalny u osobników starszych. Wyniki uzyskane w pracy [P4] pokazują, że żywienie dorosłych (2+) samic linów można oprzeć o pasze przygotowane na bazie PBM bez wpływu na wskaźniki kondycji ryb oraz parametry biochemiczne w krwi. Składnik ten jest powszechnie dostępny i tańszy niż FM, można go także bezproblemowo wprowadzić do produkcji pasz dla ryb. Należy jednak pamiętać, że nie powinien negatywnie wpływać na funkcjonowanie organów wewnętrznych oraz cechy sensoryczne surowca oferowanego konsumentom. Ten ostatni element łańcucha producent-pośrednik-odbiorca decyduje o atrakcyjności surowca rybnego, a w konsekwencji o ponownym jego wyborze.

4.2.4.4. Transkryptom jelita lina

Praca [P5] to holistyczne podejście do zagadnień związanych z odpowiedzią organizmu lina na eksperymentalne kompozycje paszowe. To także droga do zbudowania bazy sekwencji genów, które można następnie z łatwością włączyć do licznych badań nad tym gatunkiem. W ramach tej pracy wykorzystano wysokoprzepustową technikę

sekwencjonowania transkryptomów (RNA-Seq). Sekwencjonowaniu poddano 10 bibliotek RNA-Seq przygotowanych na podstawie izolatów RNA wyekstrahowanych z fragmentów jelit samic linów. Dla każdej z 10 prób uzyskano średnio po 51619586 (\pm 7290790) odczytów, które po ocenie jakości w programie FastQC złożono *de novo* zgodnie z procedurą DRAP. Podejście to umożliwiło uzyskanie 64070 kontigów o łącznej długości 52816065 par zasad z N50 = 1272 pz oraz N90 = 341 pz. Porównanie sekwencji z anotacją (43,21%) z tymi bez (44,95%) ukazało, iż większość sekwencji powyżej 1kbp posiada anotację i najwięcej zgodności sekwencji (28405) uzyskano dla gatunku *Danio rerio*. Największy udział w procesie anotacji miały białkowe bazy Refseq (43,21%), następnie Swissprot (8,12%) oraz baza stworzona dla gatunku *D. rerio* (3,1%). Wyniki pracy [P5] zawierają również informacje o polimorfizmach mikrosatelitarnych (SSR) - łącznie zidentyfikowano 23668 w 16866 kontigach, z których 4725 zawierało więcej niż jeden wariant mikrosatelitarny. Dodatkowo analiza w programie repeatmasker pokazała, że wzrost długości motywu SSR koreluje ze spadkiem liczby poszczególnych motywów, tj. 14257 SSR - 1 bp, 6180 SSR - 2 pz, 2294 SSR - 3 pz, 622 SSR - 4 pz, 243 SSR - 5 pz oraz 72 SSR - of 6 pz. Analiza polimorfizmów w złożonych sekwencjach obejmowała również identyfikację polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP), z których 118002 reprezentowało tranzycje, a 83577 transwersje. Ocenę jakości oraz kompletności anotacji uzyskanych kontigów (kompletność transkryptomu) przeprowadzono w oparciu o BUSCO, dzięki czemu wykazano, że z 429 genów (niezduplikowane ortologi) wspólnych dla organizmów eukariotycznych 70,2% znajduje się w złożonym transkryptomie jelita lina. Wysoką jakość otrzymanego transkryptomu lina potwierdzono także poprzez porównanie go metodą BLAST z referencyjnymi sekwencjami białkowymi *C. carpio* oraz *D. rerio*, dla których zgodność sekwencji wyniosła odpowiednio 15699 (lin vs. karp) oraz 13585 (lin vs. danio). Aby dopełnić procedur kontroli jakości transkryptomu porównano złożone sekwencje lina względem genomu karpia, w wyniku czego uzyskano zgodność sekwencji na poziomie 98,97%. Wynikiem, który w niestandardowy sposób potwierdził przydatność stworzonej bazy była identyfikacja 91 ze 128 sekwencji wybranych genów w transkryptomie jelita lina. Sekwencje reprezentowały geny odpowiedzialne za syntezę białek, biorących udział w procesie trawienia. Opracowaną bazę transkryptomu jelita lina opublikowano pod adresem <http://ngspipelines2.toulouse.inra.fr:9010>. Jest ona dostępna dla wszystkich osób zainteresowanych badaniami nad linem, ale także stanowi niezwykle zasobne źródło informacji użytecznych w badaniach poświęconych gatunkom pokrewnym. Baza umożliwia łatwe wyszukiwanie genów na podstawie nazw bądź sekwencji (nBLAST), jak również

polimorfizmów SSR oraz SNP niezwykle użytecznych w programach selekcji lini opartych o markery molekularne (MAS).

W pracy [P5] przetestowano także możliwość porównania transkryptomów jelita pozyskanych z dwóch grup linów, z których jedna grupa karmiona była paszą przygotowaną na bazie mączki rybnej (FM), natomiast druga - karmą przygotowaną na bazie mączki uzyskanej z produktów ubocznych przemysłu drobiarskiego (PBM). Porównanie przygotowanych transkryptomów w oparciu o programy edgeR oraz DESeq2 ujawniło, odpowiednio 721 oraz 69 kontigów które charakteryzowały się statystycznie istotnie odmiennym poziomem ekspresji (DEC, ang. differentially expressed genes) między wariantami żywieniowymi FM i PBM. Aby wyselekcjonować wspólne kontigi stworzono diagram Venna, który ukazał 57 DEC, z których 40 (70,2%) miało niższy poziom ekspresji w próbach jelit pozyskanych od ryb z wariantu PBM. Jako że tak mała liczba DEC różnicowała obie grupy transkryptomów, charakterystykę wszystkich DEC przeprowadzono w oparciu o programy BLASTn oraz BLASTx. Procedura ta ostatecznie pozwoliła na identyfikację 18 DEC zawierających charakterystyczne fragmenty sekwencji kodujących białka odpowiedzialne za rozmaite funkcje w organizmie. Największą liczbę białek reprezentowały te zaangażowane w odpowiedź immunologiczną (11), następnie adhezję komórek (2), trawienie (2), przekazywanie sygnałów międzykomórkowych (2) oraz funkcje innego rodzaju (1). W najliczniejszej grupie zidentyfikowano między innymi elementy układu dopełniacza, głównego układu zgodności tkankowej oraz receptory pełniące rolę w reakcjach obronnych organizmu. Analizując uzyskane wyniki z łatwością można stwierdzić, iż podmiana FM przez PBM nie prowadzi do bezpośrednich zmian w funkcjonowaniu szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za trawienie białek, tłuszczu bądź innych składników wchodzących w skład karmy. Tak pozornie drobna zmiana w kompozycji paszowej doprowadziła natomiast do wzbudzenia odpowiedzi obronnej oraz zmian w funkcjonowaniu błon przewodu pokarmowego samic linów. Interesującym wynikiem jest podwyższona ekspresja genów paracinguliny oraz klaudyny 2 w jelitach linów karmionych PBM, która jest wynikiem zwiększonej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych w mączce drobiowej prowadzącej do zalegania tłuszczu w jelitach [P4]. Poszukiwanie takich genów metodą real-time PCR byłoby ekstremalnie kosztochłonne, czasochłonne i zasadochłonne. Teraz gdy powszechnie dostępna baza transkryptomu jelita lina dostarcza gotowych sekwencji genów, można z powodzeniem monitorować (np. w oparciu o opracowane w pracy [P3] kalibratory) skomplikowaną fizjologię tego gatunku, co ewidentnie pokazała kończąca opisywany tutaj cykl praca [P5].

4.2.5. Podsumowanie

Doskonalenie biotechniki chowu gatunków ryb to zadanie, które wymaga stałego i intensywnego prowadzenia badań. Wystarczy spojrzeć na główne gatunki w akwakulturze, które pomimo generowania znacznych przychodów, stale wymagają zmian w sferze ich biotechniki chowu. Zagrożenie, które widzą naukowcy, a coraz częściej zauważają także i osoby spoza nauki, dotyczy hodowli, ale także i upraw, bazujących na niewielkiej liczbie gatunków. Intensyfikacja hodowli i idąca za tym homogenizacja puli genowej w celu zachowania cech produkcyjnych na opłacalnym poziomie nie jest zdaniem autora tego opracowania podstawą zrównoważonej akwakultury. Właściwym kierunkiem, choć nie jedynym, wydaje się być dywersyfikacja produkcji akwakultury, która w końcowym rozrachunku prowadzi do zwiększenia podaży surowca oferowanego konsumentom. W środowisku słodkowodnym lin jako gatunek dodatkowy, często hodowany w systemie polikultury z innymi przedstawicielami ichtiofauny, z łatwością wpisuje się w wizję akwakultury przyszłości. Liczne badania prowadzone w XX i na początku obecnego wieku pokazują niemalejące zainteresowanie tym gatunkiem. Cykl niniejszych prac wypełnił lukę w badaniach nad linem, konkretnie nad jego formą dorosłą. **Prace dostarczyły informacji** o tym, że gatunek ten wyraźnie reaguje na warunki w jakich bytuje, pokazując tym samym, że może być również hodowany w warunkach akwakultury sadzowej. Obrazowały to wyniki porównujące aktywności elementów systemu antyoksydacyjnego (SOD, GPx, CAT, GST oraz FRAP), jak również poziomy markerów funkcjonowania wątroby (ALT, AST), markera funkcjonowania mięśnia sercowego (LDH) oraz markerów stanu odżywienia (albumina, bilirubina, kwas moczowy). **Wyniki powyższych prac rzucają nowe światło** na kwestię żywienia dorosłych linów, jako że element ten stanowi znaczący udział w kosztach intensywnej hodowli sadzowej. Dlatego też w kolejnych pracach większą uwagę zwrócono na sposób monitorowania wpływu mieszanek paszowych na organizm lina. **Podejście to doprowadziło do opracowania panelu potencjalnych genów referencyjnych**, z których wytypowano dwa (*rpl8* oraz *rps11*) o cechach właściwych dla stabilnego kalibratora o niskim poziomie ekspresji. **Wykazano również, że ocena ekspresji genów metodą real-time PCR pozwala na szybką ocenę odpowiedzi organizmu ryby na podawaną paszę.** Należy jednak zwrócić uwagę na wybór ocenianych genów, gdyż niewielkie zmiany w paszy niekoniecznie muszą zmienić aktywność genów osi somatotropowej - głównego szlaku w organizmie, który kontroluje wiele istotnych procesów fizjologicznych. Ważnym elementem monitorowania reakcji lina na eksperymentalne mieszanki paszowe była ocena kondycji, wskaźników biochemicznych oraz właściwości surowca (struktura, skład chemiczny, właściwości

sensoryczne). Spośród uzyskanych wyników jedynie profil kwasów tłuszczowych, struktura filetów oraz właściwości sensoryczne zmieniły się istotnie pod wpływem zastosowanego żywienia. Jest to **ważna obserwacja o aplikacyjnym charakterze**, która wskazuje, że lin może być żywiony eksperymentalnymi mieszankami paszowymi jedynie z zachowaniem odpowiedniego udziału mączki drobiowej w ich składzie. **Innowacyjnym podejściem z zakresu nutrigenomiki było wykorzystanie techniki RNA-Seq do zbudowania bazy genów, które ulegają ekspresji w jelicie lina. Ponadto za pomocą testu żywieniowego potwierdzono użyteczność tej techniki i wskazano geny, których ekspresja zależy od skarmianych mieszanek paszowych.** Przedstawione w niniejszym autoreferacie prace [P1-P5] charakteryzują istotne aspekty związane z biotechniką chowu lina, przez co dostarczają szeregu użytecznych informacji opisujących funkcjonowanie organizmu lina. Badania były rozwinięciem doświadczeń wykonanych przez innych naukowców, co znacząco uzupełniło aktualną wiedzę o linie, a co najważniejsze otworzyło drogę do kolejnych doświadczeń nastawionych na intensyfikację produkcji tego gatunku.

4.2.6. Piśmiennictwo

Bostock J., Lane A., Hough C., Yamamoto K. 2016. An assessment of the economic contribution of EU aquaculture production and the influence of policies for its sustainable development. *Aquaculture International*, 24(3): 699-733.

Buchtova H., Svobodova Z., Flajshans M., Vorlova L. 2003. Analysis of growth, weight and relevant indices of diploid and triploid population of tench *Tinca tinca* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research*, 34: 719–726.

Calduch-Giner J.A., Sitjà-Bobadilla A., Pérez-Sánchez J. 2016. Gene expression profiling reveals functional specialization along the intestinal tract of a carnivorous teleostean fish (*Dicentrarchus labrax*). *Frontiers in Psychology*, 7: 359.

Cheng J.H., Sun D. W., Han Z., Zeng X.A. 2014. Texture and structure measurements and analyses for evaluation of fish and fillet freshness quality: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 52e61.

De Francesco M., Parisi G., Medale F., Lupi P., Kaushik S.J., Poli B.M. 2004. Effect of long-term feeding with a plant protein mixture based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 236: 413–429.

De Santis C., Smith-Keune C., Jerry D.R. 2011. Normalizing RT-qPCR data: are we getting the right answers? An appraisal of normalization approaches and internal reference genes from a case study in the finfish *Lates calcarifer*. *Marine Biotechnology*, 13:170–180.

- Enes P., Pérez-Jiménez A., Peres H., Couto A., Pousão-Ferreira P., Oliva-Teles A. 2012. Oxidative status and gut morphology of white sea bream, *Diplodus sargus* fed soluble non-starch polysaccharide supplemented diets. *Aquaculture*, 358–359: 79–84.
- Flajshans M., Linhart O. 2000. The Production of Triploid Tench (in Czech), pp. 2-14. Edice Metodik, Jihočeská Univerzita v Budejovicích VUĽRH ve Vodnanech.
- Flajshans M., Kocour M., Gela D., Piackova V. 2004. The first results on relationships among amphimictic diploid, diploid gynogenic and triploid tench, *Tinca tinca* L. under communal testing. *Aquaculture International*, 12(1): 103–118.
- González-Rodríguez Á., Celada J.D., Carral J.M., Sáez-Royuela M., García V., Fuertes J.B. 2014. Evaluation of poultry by-product meal as partial replacement of fish meal in practical diets for juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture Research*, 47(5): 1612–1621.
- González-Rodríguez Á., Celada J.D., Carral J.M., Sáez-Royuela M., Fuertes J. B. 2015. Evaluation of pea protein concentrate as partial replacement of fish meal in practical diets for juvenile tench (*Tinca tinca* L.). *Aquaculture Research*, 47(9): 1–10.
- Gu M., Kortner T.M., Penn M., Hansen A.K., Kroghdal Å. 2014. Effects of dietary plant meal and soya-saponin supplementation on intestinal and hepatic lipid droplet accumulation and lipoprotein and sterol metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 111: 432–444.
- GUS. 2016. Fizyczne rozmiary produkcji zwierzęcej w 2015 roku. Główny Urząd Statystyczny. <http://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/produkcja-zwierzece-zwierzeta-gospodarskie/fizyczne-rozmiary-produkcji-zwierzecece-w-2015-roku,3,11.html> (dostęp 09.07.2017).
- Hagen Ø., Fernandes J.M., Solberg C., Johnston I.A. 2009. Expression of growth-related genes in muscle during fasting and refeeding of juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 152: 47–53.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Hatlen B., Jakobsen J.-V., Crampton V., Alm M., Langmyhr E., Espe M., Hevrøy E.M., Torstensen B.E., Liland N., Waagbø R. 2014. Growth, feed utilisation and endocrine responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets added poultry by-product meal and blood meal in combination with poultry oil. *Aquaculture Nutrition*, 21: 714–725.
- Hsu H.-Y., Chen S.-H., Cha Y.-R., Tsukamoto K., Lin C.-Y., Han Y.-S. 2015. De novo assembly of the whole transcriptome of the wild embryo, preleptocephalus, leptocephalus, and glass eel of *Anguilla japonica* and deciphering the digestive and absorptive capacities during early development. *PLoS ONE*, 10(9): e0139105.
- Jankowska B., Zakęs Z., Żmijewski T., Szczepkowski M., Wunderlich K. 2006. The impact of diet on the slaughter field, proximate composition, and fatty acids profile of filet of tench (*Tinca tinca* L.). *Archives of Polish Fisheries*, 14: 195-211.

- Kohlmann K., Kersten P., Panicz R., Memis D., Flajšhans M., 2009. Genetic variability and differentiation of wild and cultured tench populations inferred from microsatellite loci. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20: 279-288.
- Król E., Douglas A., Tocher D.R., Crampton V.O., Speakman J.R., Secombes C.J., Martin S.A. 2016. Differential responses of the gut transcriptome to plant protein diets in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics*, 29: 17:156.
- Linhart O., Rodina M., Flajshans M., Mavrodiev N., Nebesarova J., Gela D., Kocour M. 2006. Studies on sperm of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* (L.). *Aquaculture International*, 14: 9-25.
- Livingstone D.R. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 154: 427–430.
- Lushchak V.I. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153: 175-190.
- Lushchak V.I., Bagnyukova T.V. 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 144: 283–289.
- Martin S.A.M., Król E. 2017. Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics technologies. *Developmental & Comparative Immunology*, 75: 86–98.
- Martin S.A.M., Dehler C.E., Król E. 2016. Transcriptomic responses in the fish intestine. *Development and Comparative Immunology*, 64: 103-117.
- Ostaszewska T., Korwin-Kossakowski M., Wolnicki J. 2006. Morphological changes of digestive structures in starved tench *Tinca tinca* (L.) juveniles. *Aquaculture International*, 14: 113-126.
- Panicz R., Sadowski J., Drozd R. 2012. Genetic and structural characterisation of the growth hormone gene and protein from tench, *Tinca tinca*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 38:1645-1653.
- Panicz R., Sadowski J., Schütze H., Bergmann S.M. 2015. Temperature influence on key players of the somatotrophic axis of tench, *Tinca tinca* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae). *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 45: 335–342.
- Pimpicka E. 1991. Fecundity of tench *Tinca tinca* (L.) females in Lake Drweckie. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 21: 129-141.
- Quirós M., Alvariño J.M.R. 2000. Growth and survival of tench larvae fed under different feeding strategies. *Journal of Applied Ichthyology*, 16: 32–35.
- Quirós M., Nicodemus N., Alonso M., Bartolomé M., Écija J.L., Alvariño J.M.R. 2003. Survival and changes in growth of juvenile tench (*Tinca tinca* L.) fed defined diets commonly used to culture non-cyprinid species. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 149–151.
- Rehbein H., Oehlenschläger J. 2009. *Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity*. John Wiley & Sons.
- Rennert B., Kohlmann K., Hack H. 2003. A performance test with five different strains of tench (*Tinca tinca* L.) under controlled warm water conditions. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 161–164.

- Ross, S. W.; Dalton, D. A.; Kramer, S.; Christensen, B. L., 2001: Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130: 289–303.
- Rudneva I.I. 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranchs and teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology*, 118: 255–260.
- Sams A.R. 2001. Poultry meat processing. CRC Press. Boca Raton.
- Santigosa E., García-Meilán I., Valentin J.M., Pérez-Sánchez J., Médale F., Kaushik S., Gallardo M.A. 2011. Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 317: 146–154.
- Sikorska J., Wolnicki J. 2010. Cadmium and copper toxicity to tench *Tinca tinca* (L.) larvae after a short term exposure. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 20, 3: 417-423.
- Tkachenko H., Kurhaluk N., Grudniewska J. 2013. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defences as indicators of different disinfectants exposure in the heart of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 46: 679–689.
- Trenzado C., Hidalgo M.C., García-Gallego M., Morales A.E., Furné M., Domezain A., Domezain J. 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*: a comparative study. *Aquaculture*, 254: 758–767.
- Troell M., Naylor R.L., Metian M., Beveridge M., Tyedmers P.H., Folke C., de Zeeuw A. 2014. Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 111(37): 13257-63.
- Turchini G.M., Moretti V.M., Mentasti T., Orban E., Valfré F. 2007. Effects of dietary lipid source on fillet chemical composition, flavour volatile compounds and sensory characteristics in the freshwater fish tench (*Tinca tinca* L.). *Food Chemistry*, 102: 1144-1155.
- Vinagre C., Madeira D., Narciso L., Cabral H.N., Diniz M. 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, 23: 274–279.
- Von Lukowicz M., Tamas G., Horvath L. 1986. Aquaculture of tench. In: *Aquaculture of Cyprinids*. Billard R., Marcel J., eds. INRA, Paris, pp. 357-367.
- Von Milkau. 1921. Die Resultate der Quolsdorfer Schleienzucht, ein Ansporn für die Forellenzucht. *Fischerei-Zeitung (Neudamm)*, 24: 261–263.
- Wedekind H., Rennert B. and Kohlmann K. 2003. Product quality in different strains of tench (*Tinca tinca*) tested under controlled environmental conditions. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 174-176.
- Wilhelm-Filho D., González-Flecha B., Boveris A. 1994. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 2879–2882.

- Winfield I.J., Nelson J.S. 1991. Cyprinid fishes: systematics, biology and exploitation. Chapman & Hall, London, New York. 667 pp.
- Wolnicki J., Myszkowski L. 1998. Evaluation of four commercial dry diets for intensive production of tench *Tinca tinca* (L.) juveniles under controlled conditions. Polish Archives Hydrobiology, 45: 453–458.
- Wolnicki J., Górny W. 1995. Suitability of two commercial dry diets for intensive rearing of larval tench (*Tinca tinca* L.) under controlled conditions. Aquaculture, 129: 256–258.
- Wolnicki J., Kamiński R., Myszkowski L. 2003. Survival, growth and condition of tench *Tinca tinca* (L.) larvae fed live food for 12, 18 or 24 h a day under controlled conditions. Journal of Applied Ichthyology, 19: 146–148.
- Wolnicki J., Korwin-Kossakowski M. 1993. Survival and growth of larval and juvenile tench, *Tinca tinca* L., fed different diets under controlled conditions. Aquaculture and Fisheries Management, 24: 707–713.
- Wolnicki J., Myszkowski L. 1999. Larval rearing of rheophilic cyprinids, *Aspius aspius* (L.) and *Leuciscus cephalus* (L.), on live, dry or mixed diet. Europ. Aquaculture Society Special Publication, 27: 258–259.
- Wolska L., Namieśnik J. 2002. Distribution of pollutants in the Odra river system. Part III. Organic pollutants in bottom sediments. Polish Journal Environmental Studies, 11: 663–668.
- Wolska L., Zygmunt B., Namieśnik J. 2003. Organic pollutants in the Odra river ecosystem. Chemosphere, 53: 561–569.
- Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Jarocki P., Stawecki K. 2006. The effect of feeding on oxygen consumption and ammonia excretion of juvenile tench *Tinca tinca* (L.) reared in a water recirculating system. Aquaculture International, 14:127-140.
- Zou S., Li S., Cai W., Yang H., Jiang X. 2007. Ploidy polymorphism and morphological variation among reciprocal hybrids by *Megalobrama amblycephala* x *Tinca tinca*. Aquaculture, 270: 574–579.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH

Środowisko wodne znajdowało się zawsze w kręgu moich zainteresowań i stało się podstawą wyboru kierunku studiów Biotechnologia na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Akademii Rolniczej w Szczecinie. Studiowanie na tym kierunku pozwoliło mi zaangażować się w pracę naukową poprzez uczęszczanie na warsztaty prowadzone przez koła naukowe. Efektem takich aktywności było pierwsze uczestnictwo w konferencji naukowych, praktyki w laboratoriach pozauczelnianych, czy też praca magisterska poświęcona poszukiwaniu mutacji w genomie pstrąga tęczowego oraz powiązaniu ich z cechami hodowlanymi. Podczas wielomiesięcznych badań, obejmujących pobór prób w gospodarstwie rybackim, a następnie wieloetapową procedurę poszukiwania i oceny wariantów

molekularnych, poznałem podstawy prowadzenia badań wykorzystujących techniki biologii molekularnej. Wyniki uzyskane w ramach pracy magisterskiej zostały przekazane zainteresowanym gospodarstwom pstrągowym z województwa zachodniopomorskiego oraz upublicznione w postaci anglojęzycznego artykułu naukowego [D.6].

5.1. Okres przed uzyskaniem stopnia doktora

Studia doktorancie zapoczątkowane w 2006 roku na Wydziale Nauk o Żywności i Rybactwa ówczesnej Akademii Rolniczej w Szczecinie (obecnie ZUT w Szczecinie) były dla mnie okazją do zaangażowania się w prace Zakładu Chorób Ryb, czego efektem było pierwsze doniesienie na konferencję międzynarodową, opisujące problematykę klasyfikacji taksonomicznej widłonogów [B1.8]. Następnie po zmianie jednostki na Zakład Akwakultury mogłem rozwijać swoje zainteresowania technikami biologii molekularnej poprzez zaangażowanie się równolegle w kilka inicjatyw badawczych, tj.:

- A. monitoring czynników chorobotwórczych zagrażających rodzimej ichtiofaunie,
- B. ocena zróżnicowania genetycznego populacji ryb dziko żyjących oraz stad ryb hodowlanych,
- C. charakterystyka funkcjonowania osi somatotropowej i na działanie czynników abiotycznych.

Ad. A. Monitoring czynników chorobotwórczych zagrażających rodzimej ichtiofaunie

Od początku lat XXI wieku patogenem, który w sposób szczególnie dotkliwy doświadczał słodkowodną część akwakultury był Koi Herpesvirus (CyHV-3, KHV). Dlatego też mając do dyspozycji odpowiednio wyposażone zaplecze badawcze Zakład Akwakultury zrealizował dwa główne projekty badawcze, na których realizację pozyskał środki z Sektorowego Programu Operacyjnego "Rybołówstwo i Przetwórstwo Ryb 2004-2006". Pierwszy z projektów zatytułowany „Określenie nosicielstwa i podatności na infekcje Koi-Herpes-Virusem wybranych gatunków ryb karpiowatych i ich krzyżówek pochodzących z wód otwartych i obiektów hodowlanych położonych w zlewni Odry” dostarczył informacji o obecności KHV u ryb dziko żyjących oraz tych pochodzących z ośrodków hodowlanych zlokalizowanych w obszarze zlewni Odry. Efektem prac były informacje wskazujące na wysoki poziom zmienności genomu wirusa, co w konsekwencji przekłada się na konieczność stosowania kombinacji starterów pozwalających na jego detekcję. Dodatkowym aspektem diagnostycznym było wykazanie, iż przy tak wysokim poziomie zmienności potwierdzenie obecności wirusa poprzez sekwencjonowanie jest konieczne.

W pracy stwierdzono również, że wysoki poziom zmienności genomu wirusa spowodował dostosowanie się tego patogenu do funkcjonowania w wodach o termice, która jest charakterystyczna dla Centralnej Europy (17-21°C). Kolejnym kluczowym wynikiem przeprowadzonych prac była lista 18 gatunków ryb innych niż karp, u których stwierdzono obecność KHV. Informacje te rzuciły nowe światło na możliwości rozprzestrzeniania się tego czynnika chorobotwórczego w środowisku wodnym. Zwłaszcza, że u badanych osobników wektorowych nie stwierdzono żadnych objawów chorobowych typowych dla infekcji wywoływanych tym wirusem. Ponadto badania laboratoryjne obejmujące kohabitację karpia SPF (ang. Specific Pathogen-Free) wraz z gatunkami o potwierdzonym nosicielstwie KHV, pokazały, że wirus przenoszony przez wektory może powodować śnięcia karpia. Wszystkie dane uzyskane w ramach tego projektu są wykorzystywane do ograniczenia ostrych wybuchów choroby powodowanej przez KHV poprzez wspólne otwarte działania na poszczególnych ciekach Odry [D.18, D19].

Drugi ze zrealizowanych projektów zatytułowany „Ustalenie statusu molekularnego izolatów Koi-Herpes-Virusa oraz wskazanie wektorów jego rozprzestrzeniania się wśród rodzimych gatunków ryb, małży i skorupiaków”, stanowił kontynuację i rozszerzenie badań dotyczących występowania i rozprzestrzeniania się KHV na obszarze zlewni Odry. W ramach przeprowadzonych badań terenowych oraz laboratoryjnych wykazano, że cząsteczki wirusa mogą się gromadzić w organizmach bezkręgowców takich jak: szczeżuja wielka (*Anodonta cygnea*) oraz kielż zdrojowy (*Gammarus pulex*). Gatunki te naturalnie występują w rozmaitych typach środowisk, i jak wynika z badań, mogą stanowić rezerwuar KHV w stawach karpionych. Badania molekularne potwierdziły również potrzebę stosowania zróżnicowanego podejścia do detekcji tego patogenu [A.17]. Wyniki uzyskane w ramach obu projektów zostały upowszechnione w formie doniesień podczas konferencji międzynarodowych [B1.4, B1.5, B1.7, B1.9] oraz krajowych [B2.2]. Dodatkowo rezultaty zaprezentowane zostały w formie prezentacji ustnych podczas konferencji krajowej [K.14] oraz międzynarodowej [K.19], na udział w której otrzymałem stypendium konferencyjne przyznane przez University of Florida oraz American Fisheries Society. Rozwój diagnostyki wirusologicznej KHV w oparciu o PCR, hybrydyzację *in situ* oraz test immunofluorescencji pośredniej umożliwił również wykazanie, że dwa gatunki ryb jesiotrowatych, jesiotr rosyjski (*A. gueldenstaedtii*) oraz jesiotr atlantycki (*A. oxyrinchus*) mogą być również aktywnymi i bezobjawowymi wektorami tego wirusa. Dodatkowo porównanie skuteczności detekcji KHV z wykorzystaniem kilku powszechnie stosowanych par starterów pozwoliło na wytypowanie jednej pary oraz wskazanie, że najskuteczniejszą metodą była hybrydyzacja

in situ [D.11], jeśli próby pobierano przyżyciowo. Rozszerzone badania nad gatunkami jesiotrowatymi, tj. jesiotrem syberyjskim (*Acipenser baerii*), atlantyckim oraz rosyjskim, wykazały również obecność innego groźnego czynnika chorobotwórczego, jakim jest WSIV (ang. white sturgeon iridovirus). Nasze pionierskie badania potwierdziły obecność WSIV w Polsce po raz pierwszy w 2007 r., a analizy, które upowszechniono podczas konferencji w Paryżu [B1.10], prowadzone są nadal w Zakładzie Akwakultury ZUT w Szczecinie. Należy nadmienić, iż w grupie licznych przykładów diagnozowania czynników chorobotwórczych, opisywanych w tej części opracowania, nie może zabraknąć informacji dotyczących metod innych niż molekularnych. Takim przykładem była charakterystyka przypadku włókniaka u karasia złocistego (*Carassius auratus*), która była możliwa dzięki zastosowaniu połączenia technik mikroskopii konwencjonalnej oraz elektronowej [D.10].

Ad. B. Zróżnicowanie genetyczne ryb dziko żyjących oraz hodowlanych

Istotnym elementem efektywnego zarządzania populacjami bądź stadami ryb jest konieczność wcześniejszego posiadania informacji o ich zróżnicowaniu genetycznym. W pracy [D.9] wykorzystano region ND-1 mitochondrialnego DNA, na podstawie którego scharakteryzowano zróżnicowanie genetyczne populacji siei (*Coregonus lavareus*) zamieszkujących jeziora Polski (Ińsko, Woświn, Miedwie, Marianowo, Wisola, Czarne, Śremskie, Morzycko), Austrii (Traunsee) i Szwajcarii (Lucerne). Wskazano, iż największym zróżnicowaniem wewnątrzpopulacyjnym charakteryzowały się populacje siei zamieszkujące jeziora Ińsko, Miedwie, Marianowo, Wisola, Śremskie, Morzycko oraz Lucerne. Natomiast najniższym - sieje z jezior Woświn, Czarne oraz Traunsee, w których stwierdzono tylko jeden haplotyp H2. Haplotyp ten był też najczęściej obserwowany (68,42%) wśród wszystkich 10 przebadanych populacji. Analizy genetyczne ujawniły również obecność nowego, wcześniej nienotowanego haplotypu u siei bytujących w jeziorze Lucerne oraz potwierdziły wpływ programów zarybieniowych na liczbę haplotypów. Było to widoczne po przeanalizowaniu historii zarybieniowych dla jeziora Śremsko oraz liczby haplotypów (pięć) zidentyfikowanych w opisywanej pracy. Kolejne badania związane z oceną zróżnicowania genetycznego w populacjach jelca (*Leuciscus leuciscus*) oraz w obrębie wybranych gatunków Anguilliformes pozwoliły na przedstawienie danych na temat zróżnicowania genetycznego populacji jelca rzek Wisły, Odry oraz Niemna [B2.5]. Natomiast aktywność naukowa związana z oceną cech biometrycznych oraz genetycznych wybranych gatunków węgorzy zaowocowała początkowo doniesieniem zaprezentowanym podczas ogólnopolskiej konferencji [B2.3] oraz pracą opublikowaną w czasopiśmie naukowym [D.12]. Dodatkowo

temat ten był na tyle interesujący oraz istotny, że w ciągu kolejnych lat wraz z zespołem dopracowaliśmy procedurę identyfikacji genetycznej gatunków węgorzy, która wielokrotnie stała się podstawą ekspertyz wykonywanych na zlecenie podmiotów zewnętrznych wyszczególnionych w sekcji M załącznika nr 4. Oceny morfologiczne były również konieczne podczas identyfikowania oraz charakteryzowania nowych gatunków, które zostały złowione w wodach Polski po raz pierwszy, jak to miało miejsce w przypadku zbrojnika lamparciego (*Pterygoplichthys gibbiceps*) [D.13].

Zróżnicowanie genetyczne populacji oraz stad hodowlanych lina oceniano w pracy opublikowanej w 2009 r. na podstawie 792 prób [A.18]. Największe zróżnicowanie genetyczne stwierdzono u linów z Niemiec, które pozyskano ze zbiornika Felchowsee oraz hodowli Königswartha. Natomiast najniższe dla linów hodowlanych z Hiszpanii, które charakteryzowały się homozygotycznym układem alleli w każdym z analizowanych loci. Niskie zróżnicowanie zaobserwowano dla populacji lina z tureckiego jeziora Sapanca oraz z hodowli w Chinach. Interesujący jest fakt, że najniższe zróżnicowanie genetyczne linów obserwowano pomiędzy Turcją, Hiszpanią oraz Chinami, czyli krajami, które dzielił największy dystans geograficzny. Badania te sugerowały, iż osobniki z tych populacji należały do wschodniej linii linów, gdyż na drzewie obrazującym filogenezę tego gatunku liny z tych trzech lokalizacji tworzyły jedną gałąź o wysokiej wartości poparcia (bootstrap = 100%). Zachodnia linia linów odzwierciedliła natomiast mieszaną poszczególnych genotypów linów, która w dużej mierze wynikała z translokacji oraz krzyżówek stworzonych na podstawie linów z różnych rejonów Europy. Dane uzyskane w ramach tej pracy dostarczyły pierwszych tak obszernych informacji o zróżnicowaniu genetycznym lina, co w znaczący sposób wpłynęło na sposób zarządzania zasobami genetycznymi tego gatunku.

Ad. C. Charakterystyka funkcjonowania osi somatotropowej lina

Trzecią inicjatywą naukową omawianego okresu były badania związane z pracą doktorską zatytułowaną „Zastosowanie metody real-time PCR oraz kompetycyjnego testu ELISA do określenia potencjału wzrostowego lina *Tinca tinca* L.”. Cykl analiz prowadzonych w ramach tej pracy doprowadził do ustalenia pierwszej pełnej sekwencji genu hormonu wzrostu (*gh*) lina, która to została zdeponowana w bazie GenBank i opatrzona numerem akcesyjnym HM114351.1. Zamieszczona w bazie sekwencja *gh* liczyła 1776 pz i składała się z 5 egzonów o łącznej długości 633 pz. Sekwencje *gh* opracowane dla linów przeanalizowano również pod kątem mutacji, gdyż jak powszechnie wiadomo mogą one mieć kolosalne znaczenie dla funkcjonowania kodowanego przez nie białka. Dlatego też ustalenie pełnej

sekwencji otworzyło drogę do kolejnego etapu badań, w którym opracowano przestrzenny model białka hormonu wzrostu lina. Składał się on z 4 helis biegnących w układzie góra-góra-dół-dół poczynając od N-końca peptydu. W sekwencji aminokwasowej zidentyfikowano 5 charakterystycznych reszt cysteinowych (Cys 71, Cys 145, Cys 183, Cys 200 oraz Cys 208) oraz dwa miejsca N-glikozylacji (Asp 155 i Asp 207). Ze względu na strukturę białko to należy do nadrodziny ligandów hematopoetycznych. Dalsze prace nad modelem umożliwiły zidentyfikowanie reszt aminokwasowych, które mogą być zaangażowane w łączenie z receptorem hormonu wzrostu, tj. Lys 186, His 189, Lys 190 oraz Thr 193.

Druga części pracy doktorskiej obejmowała część eksperymentalną, w której testowano wpływ różnych wartości temperatury wody (10°C, 15°C, 20°C, 25°C) na poziom ekspresji genu hormonu wzrostu w przysadce mózgowej, wątrobie oraz mięśniach samic i samców linów. Dodatkowym celem badań było również określenie czy poziom hormonu wzrostu oraz insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I w osoczu i wątrobie są zależne od wariantu temperaturowego. Wyniki dotyczące aktywności genów wykazały, że głównym miejscem ekspresji jest przysadka mózgowa, następnie mięśnie, natomiast najniższą aktywność stwierdzono w hepatocytach. Ze względu na wysoką zmienność wartości Ct uzyskanych w metodzie real-time PCR nie potwierdzono zależności pomiędzy wzrostem temperatury oraz aktywnością *gh*. Z kolei pomiar aktywności osi somatotropowej na poziomie białek ujawnił, że poziom stężenia hormonu wzrostu zwiększał się wraz ze wzrostem temperatury do poziomu 20°C, a następnie spadał. Obserwowana tendencja dotyczyła obu typów badanych prób, zarówno pobranych od samic, jak i samców lina, co potwierdziło wpływ wzrostu temperatury wody na poziom hormonu wzrostu. Dodatkowo badania wykazały, że po przekroczeniu temperatury wody 20°C hormon wzrostu jest efektywnie wyłapywany i wiązany przez swój receptor. Analiza wartości uzyskanych dla drugiego z badanych białek wykazała, że wzrost temperatury od 10°C do 25°C powoduje stałe i stopniowe zwiększenie się stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu typu I w hepatocytach. W przypadku prób osocza obserwowano zależność odwrotną – wzrost temperatury powodował spadek stężenia tego białka. Zaobserwowane zależności dostarczyły informacji związanych z dynamiką funkcjonowania osi somatotropowej lina, ukazując jak funkcjonuje sprzężenie zwrotne wywierane przez insulinopodobny czynnik wzrostu typu I na syntezę hormonu wzrostu regulowaną poziomem aktywności somatostatyny. Wyniki opisywane w niniejszej sekcji stanowiły podstawę rozprawy doktorskiej, którą obroniłem z wyróżnieniem 17 listopada 2010 r. Część wymików badań opracowałem dzięki współpracy z naukowcami z Friedrich-Loeffler-Institut (Niemcy), gdzie kilkukrotnie wyjeżdżałem na staż

celem zrealizowania części badań. Natomiast publikacje charakteryzujące strukturę genu oraz białka hormonu wzrostu lina [A.16], jak i aktywność elementów osi somatotropowej [A.7] zostały wydane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu. Informacje na temat moich badań nad linem zaprezentowałem również podczas międzynarodowej konferencji w Ceresole d'Alba, Włochy [B1.6].

5.2. Okres po uzyskaniu stopnia doktora

Moja aktywność naukowa po obronie doktoratu znacząco się zwiększyła i obok głównego problemu badawczego, który stanowi podstawę niniejszego postępowania habilitacyjnego, skupiała się głównie wokół następujących zagadnień:

- D. genetyka populacyjna ryb i bezkręgowców w kontekście monitorowania i ochrony zasobów,
- E. monitoring czynników chorobotwórczych zagrażających ichtiofaunie,
- F. analiza możliwości opracowania nowych produktów spożywczych.

Ad. D. Genetyka populacyjna ryb i bezkręgowców w kontekście monitorowania i ochrony zasobów

Identyfikacja gatunków, ocena zróżnicowania genetycznego czy też efektywne zarządzanie populacjami musi się opierać o wiarygodną bazę danych przygotowaną na podstawie reprezentatywnie pobranych prób. W ramach swej działalności uczestniczyłem w realizacji projektu zatytułowanego „Opracowanie genetycznego systemu identyfikacji produktów żywnościowych pochodzących z rybołówstwa i akwakultury wprowadzanych na obszar celny Unii Europejskiej” – Celfish. W ramach tej inicjatywy został zgromadzony kilkunastotysięczny zbiór płetw ryb, pozyskanych w kilkudziesięciu państwach z sześciu kontynentów. Następnie z wytypowanych płetw wyizolowano DNA oraz zamplifikowano i zsekwencjonowano fragmenty sekwencji rodopsyny, który pełni funkcję znacznika gatunkowego. Tak zgromadzone zasoby zostały przygotowane w celu wspierania pracowników Urzędu Celnego podczas prac związanych z identyfikacją ryb i produktów rybnych. Badania przeprowadzone na podstawie zgromadzonych prób stały się również podstawą do przygotowania czterech prac [A.2, A.3, A8, A.9], opublikowanych w czasopismach o międzynarodowym zasięgu. W pracach tych oceniano stan wybranych populacji ryb w analizowanych rejonach świata. Dzięki projektowi Celfish pracownicy Izby Celnej w Szczecinie, Inspektoratu Rybołówstwa, Granicznej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej, Inspekcji Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych

w Szczecinie oraz przedstawiciele sektora przetwórstwa rybnego zainteresowali się problematyką związaną z poprawnym oznakowaniem ryb i produktów rybnych sprowadzanych na teren Unii Europejskiej. Informacje kluczowe dla wyżej wymienionych grup osób zostały przedstawione podczas czterech szkoleń w Kołobrzegu, które wraz ze współwykonawcami projektu przygotowałem w latach 2011-2014.

Badania nad zróżnicowaniem genetycznym siei, zainicjowane w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora, były kontynuowane i rozwijane także i po tym okresie. Przeprowadzono dokładną analizę populacji siei aktualnie zajmującej jezioro Miedwie, porównano jej poziom zróżnicowania genetycznego względem archiwalnych prób, pozyskanych z berlińskich zbiorów Museum für Naturkunde oraz określano czy sieje z tego zbiornika są hybrydą powstałą ze skrzyżowania siei i pelugi (*Coregonus peled*), [A.15]. Wyniki analiz genetycznych wykazały, iż badane ryby zasiedlające jezioro Miedwie nie są hybrydami oraz ich genotyp odpowiada tym archiwalnym sprzed ponad wieku. Jest to również punkt odniesienia, względem którego przygotowywane są ekspertyzy dla Modehpolmo - użytkownika rybackiego prowadzącego zarybienia sieją na jeziorze Miedwie. W ramach innych badań populacyjnych uczestniczyłem również w analizach przeprowadzonych dla innych gatunków, takich jak karaś srebrzysty (*Carassius gibelio*), [D.2], karaś pospolity (*Carassius carassius*), [D.8], sterlet [D.7], czy też hybrydy międzygatunkowe *Cyprinus carpio* × *Carassius auratus* [A.14]. Istotną częścią mojej aktywności naukowej były prelekcje wygłoszone podczas krajowych [K1.2] oraz międzynarodowych [K1.1, K1.4, K1.5, K1.6, K1.7, K1.8] konferencji poświęconych rozwojowi zrównoważonej akwakultury. Znajomość trendów związanych z rozwojem akwakultury zaowocowała współrealizacją projektu o akronimie CERES (Climate change and European aquatic RESources) w ramach ogólnoeuropejskiej inicjatywy Horyzont 2020. Jako partner projektu jestem współodpowiedzialny za dostarczenie danych niezbędnych do stworzenia modelu pozwalającego na wytypowanie czynników, które będą miały największy wpływ na rozwój akwakultury i rybołówstwa w Centralnej Europie. Dodatkowo modele oraz inicjatywa „Typical farm” zostanie wzbogacona danymi eksperymentalnymi, które wstępnie zostały zaprezentowane podczas XXII Krajowej Konferencji-Szkolenie Hodowców Karpia [D.16, B2.1] na początku 2017 r., a w formie rozszerzonej zostaną przedstawione podczas konferencji European Aquaculture w Dubrowniku (17-20.10.2017r.).

Z badań oceniających zróżnicowanie genetyczne w obrębie rozmaitych populacji bądź stad ryb [B1.1] oraz bezkręgowców [A.6, B1.3] wyklarował się wśród moich badań silny nurt w kierunku aktywnej ochrony gatunków. Efektem działań w tym kierunku był projekt

poświęcony ocenie zróżnicowania genetycznego populacji raka szlachetnego (*Astacus astacus*) na Pomorzu. Projekt pozwolił na zgromadzenie danych genetycznych, które odzwierciedlają kondycję populacji tego gatunku oraz są wykorzystywane w programach sztucznego rozrodu raka szlachetnego. Wyniki badań zostały zaprezentowane podczas konferencji astakologicznej w Landau (Niemcy) oraz podczas konferencji uświetniającej pierwszą rocznicę powstania Polskiego Towarzystwa Genetyki Konserwatorskiej LUTREOLA. Wraz z pierwszymi członkami byłem współzałożycielem tego Towarzystwa w 2015 r., a w 2016 r. zostałem powołany do pełnienia funkcji przewodniczącego Rady Naukowej PTGK LUTREOLA. W ramach działalności Towarzystwa oraz we współpracy z innymi podmiotami pozyskałem finansowanie na realizację dwóch projektów z zakresu genetyki konserwatorskiej, tj. "Science in the service of nature - gene pools conservation of endangered and threatened mammalian species by knowledge transfer and experience sharing on the best practices in conservation genetics of teriofauna" oraz "Exchange of knowledge, experiences and best practices in study and control of the invasive alien species populations in Iceland and Poland". Wyniki uzyskane w ramach realizowanych projektów oraz działalności Towarzystwa [D.14, D.15] zostaną zaprezentowane podczas międzynarodowej konferencji "Nauka w służbie przyrody – genetyka konserwatorska I przeciwdziałanie inwazjom biologicznym", której jestem współorganizatorem. Podejmowane inicjatywy, które łączą analizy genetyczne oraz identyfikację gatunków zaowocowały zaproszeniem mnie do zespołu redakcyjnego czasopisma Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems (IF₂₀₁₆ = 1,217), opublikowaniem pracy o nowym gatunku w Morzu Bałtyckim [A.5], jak również dwóch prac o zróżnicowaniu genetycznym przywr digenetycznych [A.11, A.12].

Ad. E. Monitoring czynników chorobotwórczych zagrażających ichtiofaunie

Oprócz genetycznej identyfikacji wirusów stanowiących istotne zagrożenie dla hodowanych ryb istotną kwestią była identyfikacja wektorów, które mogą powodować śnięcia u karpia [A.13]. Dlatego też dzięki przeprowadzonemu doświadczeniu kohabitacyjnemu potwierdzono, że płocie (*Rutilus rutilus*), okonie (*Perca fluviatilis*), liny, jazgarze (*Gymnocephalus cernuus*), tołpygi białe (*Hypophthalmichthys molitrix*) oraz amury (*Ctenopharyngodon idella*), u których wcześniej potwierdzono nosicielstwo KHV, powodują śnięcia karpia SPF.

W spektrum moich zainteresowań badawczych znalazła się również identyfikacja wirusa Herpesvirus anguillae (AngHV-1, HVA). Wyniki badań [A.10] wykazały obecność

AngHV-1 w próbach węgorza europejskiego pozyskanych w wodach Zalewu Szczecińskiego oraz jeziora Dąbia. Badania również wykazały, iż źródłem AngHV-1 mogą być węgorze sprowadzane z Danii w celach zarybieniowych. Interującym wynikiem, były także pierwsze informacje o zidentyfikowaniu tego wirusa u węgorzy amerykańskich (*A. rostrata*). Obecność AngHV-1 w węgorzach europejskich pozyskanych z innych lokalizacji w północno-zachodniej Polsce potwierdzono w pracy [A.4]. Wykazano także, że bezobjawowymi nosicielami tego wirusa mogą być ryby należące do gatunków takich jak sterlet, okoń, karaś srebrzysty, sandacz (*Stizostedion lucioperca*) oraz babka piaskowa (*Neogobius melanostomus*), [D.4]. Wyniki uzyskane w ramach tych prac rzuciły nowe światło na konieczność wskazania optymalnej metody detekcji AngHV-1. W pracy [A.1] porównano skuteczność detekcji wirusa w próbach skrzeli, skóry, serca, nerki oraz śledzony drogą konwencjonalnej techniki PCR, nested PCR oraz poprzez hodowlę komórkową. Spośród wszystkich metod najwyższą czułością wykazała się technika nested PCR, która na podstawie wyników z tej pracy jest rekomendowana do detekcji AngHV-1.

Ad. F. Analiza możliwości opracowania nowych produktów spożywczych

W związku ze zmianą afiliacji w 2014 r. z Zakładu Akwakultury na Katedrę Technologii Mięsa, zmianie uległ także i profil moich badań. Efektem włączenia się w badania prowadzone przez pracowników Katedry stały się elementy pracy [P4], w której zastosowano techniki histologiczne oraz ocenę sensoryczną do oceny mięsa lina. Wieloletnie badania związane ze środowiskiem wodnym pozwoliły mi na znalezienie niszy badawczej, w której łączę elementy związane z analizami genetycznymi, środowiskiem wodnym oraz naukami o żywności. Wyrazem takich działań są zajęcia dydaktyczne prowadzone dla polskich studentów (np. Nutrigenomika, Bioinformatyka, Surowce rzeźne) bądź zagranicznych (Bioinformatics, Genetic control of meat quality traits, Techniques of molecular biology), udział w tematycznych konferencjach naukowych, opracowania naukowe oraz projekty badawcze. Pierwszą z takich konferencji była XLII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności PAN [K2.3], podczas której wygłosiłem prezentację pt. „Zagrożenia związane z niewłaściwym oznakowaniem importowanych surowców pochodzenia morskiego”. W następstwie przedstawionych informacji oraz późniejszych dyskusji opublikowałem pracę [D.5], w której przedstawiono funkcjonowanie systemu wczesnego ostrzegania o niebezpiecznych produktach żywnościowych i środkach żywienia zwierząt (RASFF) oraz przedstawiono analizę najczęstszych zagrożeń ze strony produktów rybołówstwa i akwakultury w latach 2014-2016. Informacje dotyczące monitorowania

produktów rybnych za pomocą systemu RASFF spotkały się z zainteresowaniem środowiska naukowego, czego efektem była kolejna prelekcja [K2.2] oraz opublikowanie pracy, w której dokładnie omówiono trendy, gatunki ryb oraz towarzyszące im zagrożenia w kontekście produktów rybołówstwa i akwakultury importowanych do UE z Afryki [D.3].

Kolejnym kierunkiem badań wywodzącym się z wcześniejszych eksperymentów były analizy dotyczące nowych możliwości wykorzystania mięsa raków oraz gatunków ryb, które są powszechnie hodowane bądź poławiane w Polsce. Scharakteryzowano surowiec mięsny pozyskiwany od raków [D.1], a do działalności badawczej Katedry włączono prace mające na celu przetestowanie możliwości włączenia mięsa raków do produkcji artykułów spożywczych. Nowe możliwości zagospodarowania wybranych gatunków ryb zostaną opracowane w ramach kolejnego projektu o akronimie SEAFOODTOMORROW, który będzie realizowany przez najbliższe trzy lata w ramach inicjatywy Horyzont 2020. Projekt ten będzie obejmował fortyfikację karpia mieszankami paszowymi, m.in. na bazie mikro i makroglonów, a następnie produkcję artykułów mięsnych skierowanych do trzech wytypowanych grup docelowych. Natomiast w przypadku ryb odłowionych ze środowiska produkty zostaną odpowiednio zaprojektowane uwzględniając ich skład chemiczny oraz właściwości technologiczne czy też sensoryczne. Ważnym elementem tych badań jest także włączanie studentów I, II oraz III stopnia do badań prowadzonych w Katedrze, w których największy nacisk jest kładziony na ich interdyscyplinarny oraz aplikacyjny charakter.

Moja działalność naukowa w tym okresie nie koncentrowała się wyłącznie na publikowaniu wyników badań. Swój warsztat badawczy doskonaliłem na krajowych i zagranicznych kursach i stażach naukowych (m.in. na Uniwersytecie Stanforda w USA w ramach inicjatywy Top 500 Innovators). Brałem aktywny udział w międzynarodowych i krajowych projektach badawczych. Moja praca została dostrzeżona, czego potwierdzeniem było wykonanie recenzji prac naukowych publikowanych w czasopiśmie JCR, jak również szeregu ekspertyz naukowych. Skutkiem mojego zaangażowania naukowego było także powierzenie mi funkcji Pełnomocnika Dziekana ds. współpracy naukowo-dydaktycznej z zagranicą oraz funkcji promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim Nguyena Thuc Tuana, doktoranta z Wietnamu.

5.3. Aplikacyjny charakter prowadzonych badań

Badania realizowane zarówno przed, jak i po uzyskaniu stopnia doktora, były prowadzone pod kątem ich przydatności. Nawet jeśli pierwsza z serii prac nie przynosiła

gotowego rozwiązania w postaci testu molekularnego, mapy epizootycznej, bazy profili genetycznych czy też planu działania na skutek pojawienia się nowego patogenu, to kolejne prace rozwijały i zgłębiały dane zagadnienie. Badania mające na celu określenie stopnia zainfekowania rodzimej ichtiofauny przez CyHV-3, AngHV-1 lub WSIV doprowadziły do określenia zasięgu oraz intensywności występowania danego patogenu, podniesienia świadomości o drogach rozprzestrzeniania się zagrożenia oraz opracowania i przetestowania testów diagnostycznych. Obserwując zmieniające się warunki klimatyczne (CERES), które znacząco wpływają na środowisko wodne można z dużą dozą prawdopodobieństwa założyć, że w najbliższym czasie pojawią się kolejne zagrożenia dla ichtiofauny związane z pojawieniem się nowych patogenów. Takie zależności obserwowaliśmy do tej pory badając ryby pochodzące z wód o podniesionej termicie, w których dodatkowo obecność nowych gatunków uwolnionych przez akwarystów podnosi zagrożenie w związku z nowymi patogenami. Zatem w dobie zwiększonego zapotrzebowania na produkty pochodzenia wodnego, w tym wypadku słodkowodnego, konieczność rozsądnego zarządzania stadami i populacjami ryb jest nad wyraz konieczna. Dlatego też moja aktywność naukowa skupiała się również na ocenie zróżnicowania populacji. Przykładem praktycznego wykorzystania wyników moich badań jest zarządzanie populacją siei miedwiańskiej, dla której początkowo potwierdziliśmy pierwotne genotypy, a następnie wyklucziliśmy ewentualne krzyżówki międzygatunkowe. Obecnie, współpracując z gospodarstwem rybackim operującym na tym zbiorniku, uczestniczę jako partner naukowy w pracach zarybieniowych. Nie ograniczając się do przykładów populacji ryb, kluczową częścią badań w projekcie skupionym na aktywnej ochronie populacji raka szlachetnego na Pomorzu były badania genetyczne, które wspomagały proces wyboru samic i samców do rozrodu. Obecnie w zbiorach posiadamy bazę profili genetycznych populacji raka szlachetnego z regionu Pomorza. Aplikacyjny charakter stworzonych baz genetycznych jest widoczny nie tylko w postaci opublikowanych prac naukowych charakteryzujących stan wybranych populacji ryb, przygotowywanych ekspertyzach, ale też w samym zainteresowaniu podmiotów zewnętrznych wykorzystaniem takich zasobów.

Zastosowanie praktycznie, to też główny element badań realizowanych w ramach projektów Horyzont 2020. Zarówno w projekcie CERES, jak i w SEAFOODTOMORROW opieramy swoje badania o skalę TRL (ang. technology readiness level), czyli gotowość aplikacyjna technologii. W pierwszym z nich pracujemy nad opracowaniem scenariuszy zmian klimatycznych dla naszego regionu oraz stworzeniem rekomendacji w jaki sposób dopasować akwakulturę oraz rybołówstwo do zachodzących zmian aby zmaksymalizować

produkcję oraz przychody przy jednoczesnym zachowaniu zrównoważonego korzystania z zasobów naturalnych. W drugim z projektów mamy za zadanie opracować produkty na bazie wybranych gatunków ryb, które poprzez swe wartości odżywcze oraz inne cechy mają odpowiedzieć na potrzeby dzieci, kobiet w ciąży oraz osób starszych w zakresie spożywania produktów o podwyższonej zawartości selenu, jodu czy też PUFA.

Aplikacyjne elementy badań to kluczowy ich element, który jest efektem rozmów z grupą potencjalnych odbiorców, aby dokładnie zidentyfikować ich potrzeby i prowadzić badania we właściwym kierunku. Był to zawsze ważny element pracy zespołów, w których pracowałem bądź nadal pracuję. Z perspektywy ostatniej dekady obserwuję, iż świat nauki podlega dynamicznym przemianom, do których my naukowcy musimy się stale adaptować. Jest to szczególnie widoczne w rozwiązaniach dostarczanych w ramach rozmaitych badań, ale także i w rosnących potrzebach ze strony społeczeństwa oraz otaczającego nas środowiska, w którym żyjemy i o które musimy się troszczyć.

