

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

JOLANTA KEMPTER

**ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA WYBRANYCH
POPULACJI CERTY *VIMBA VIMBA* (L.)
NA PODSTAWIE ANALIZY MOLEKULARNEJ
GENU CYTOCHROMU B
W ASPEKCIE OCHRONY GATUNKU**

SZCZECIN 2010

Recenzenci
TOMASZ HEESE
JACEK WOLNICKI

Opracowanie redakcyjne
ANNA MARIAŃSKA

WYDANO ZA ZGODĄ
REKTORA ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIwersYTETU TECHNOLOGICZNEGO W SZCZECINIE

ISBN 978-83-7663-070-0

Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
70-311 Szczecin, al. Piastów 50, tel. 91 449-47-60, e-mail: wydawnictwo@zut.edu.pl
Druk PPH Zapol, Dmochowski, Sobczyk Sp.j., 71-062 Szczecin, al. Piastów 42, tel. 91 434-10-21
e-mail: zarzad@zapol.com.pl

Spis treści

1. Wstęp	5
1.1. Charakterystyka gatunku <i>Vimba vimba</i>	6
1.1.1. Gatunek w ujęciu biologicznym	6
1.1.2. Status taksonomiczny gatunku <i>Vimba vimba</i>	7
1.1.3. Wybrane zagadnienia z biologii certy	7
1.1.4. Zmienność gatunkowa i wewnątrzgatunkowa	8
1.1.5. Spadek liczebności i ochrona gatunku	11
1.2. Metody genetyczne wykorzystywane w badaniach populacyjnych ryb ze szczególnym uwzględnieniem analizy cytochromu b (cyt. b)	15
1.2.1. Analiza genu cytochromu b	18
2. Cel pracy	21
3. Materiał i metody	23
3.1. Ryby	23
3.2. Metodyka badań	24
3.2.1. Izolacja DNA i elektroforeza testowa	26
3.2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	26
3.2.3. Elektroforeza żelowa	28
3.2.4. Analiza restrykcyjna (PCR-RFLP)	28
3.2.5. Sekwencjonowanie fragmentu genu cytochromu b	29
3.2.6. Analiza sekwencji	30
4. Wyniki	33
4.1. Izolacja DNA	33
4.2. Trawienie enzymami restrykcyjnymi i charakterystyka pozyskanych haplotypów	33
4.3. Uliniowanie pozyskanych sekwencji i analiza poziomu ich zmienności	38
5. Dyskusja	45
5.1. Zróżnicowanie rodzimych populacji certy w aspekcie ochrony gatunku i zachowania bioróżnorodności	45
5.1.1. Zlewnia Wisły	45
5.1.2. Zlewnia Odry	45
5.1.3. Zmienność genetyczna certy	48
5.2. Analiza zmienności wybranych europejskich populacji a program ochrony gatunku	53
6. Wnioski	57
Piśmiennictwo	59
Summary	67
Zusammenfassung	69

1. Wstęp

Prowadzenie badań nad zmiennością gatunkową jest fundamentalnym elementem ochrony przyrody, o czym mówi Konwencja o różnorodności biologicznej. Po czterech latach prac, podczas Szczytu Ziemi w Rio de Janeiro w maju 1992 roku, podpisano jej tekst. Polska jako jedno ze 167 państw, które podpisały dokument, jest zobligowana do opracowywania krajowych strategii, planów i programów mających na celu ochronę i zrównoważone użytkowanie zasobów. Konieczność wypełniania nałożonych na nasz kraj obowiązków sprawia, że trzeba prowadzić badania umożliwiające genetyczną charakterystykę poszczególnych gatunków roślin i zwierząt, w szczególności gatunków zagrożonych. Do takich gatunków należy certa (*Vimba vimba*), która jest obecna na polskiej „Czerwonej liście słodkowodnych minogów i ryb” [Witkowski i inni, 2009]. Gatunek ten uznano za jeden z 37 najbardziej zagrożonych taksonów i zaszeregowano do kategorii gatunków krytycznie zagrożonych (CR). Oznacza to, że stwierdzono wysokie ryzyko wymarcia tego gatunku w środowisku naturalnego występowania. W celu ochrony certy w Polsce należy wprowadzać formy ochrony aktywnej i wzmacniać populacje występujące w dorzeczu Odry, Wisły i rzekach Pobrzeża Bałtyku. Polityka państwa powinna zatem wspierać wszelkie działania na rzecz „utrzymywania rzadkich lub ginących odmian i ras wykorzystywanych rolniczo lub zagrożonych gatunków ryb” [Trzeci krajowy raport z wdrażania Konwencji o różnorodności biologicznej, 2005]. Wśród zagrożonych gatunków ryb szczególne miejsce zajmują gatunki dwuśrodowiskowe: łosoś (*Salmo salar*), troć wędrowną (*S. trutta trutta*), sieja wędrowną (*Coregonus lavaretus*), węgorz (*Anguilla anguilla*) i certa, które są szczególnie narażone na zanik z powodu zablokowania tras ich wędrówek. W programie „Zrównoważony rozwój sektora rybołówstwa i nadbrzeżnych obszarów rybackich 2007–2013” szczególny nacisk położono na budowę nowych urządzeń oraz remontowanie już istniejących, które przywrócą drożność w rzekach.

Obecnie w ramach różnych funduszy wspierających działania środowiskowe realizowane są programy restytucji gatunków ryb tzw. sztandarowych, których ochrona aktywnie wspiera także inne towarzyszące im gatunki. Należy tu wymienić program restytucji jesiotra ostronosego (*Acipenser oxyrhynchus*) koordynowany przez Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie [Kolman, 2007], projekt restytucji ryb wędrownych w Polsce opracowany dla jesiotra zachodniego (*A. sturio*), łososia, troci wędrownej oraz certy w dorzeczach Wisły i Odry [Witkowski i inni, 2004].

Chcąc wypełnić obowiązki nałożone na Polskę przez konwencję, trzeba prowadzić badania umożliwiające genetyczną charakterystykę poszczególnych gatunków roślin i zwierząt. W artykule 8 konwencji wskazano na konieczność przechowywania materiału biologicznego, takiego jak zamrożone nasienie, komórki jajowe, tkanki lub DNA. Niezbędna jest genetyczna charakterystyka poszczególnych populacji danego gatunku, występujących w różnych ekosystemach, w celu oznaczenia ich homogenności lub stopnia zróżnicowania. Opracowanie genetycznej bazy danych dla każdego gatunku pozwoli na wskazanie populacji o małej liczebności oraz tych, które ze względu na zbyt dużą homogenność są w stanie degradacji genetycznej.

Obecnie intensywnie rozwijany jest program genetycznego metkowania roślin i zwierząt (DNA barcoding), który umożliwi szybszą ich identyfikację. Powołano także organizację Fish Barcode of Life Initiative (FISH-BOL), która zrzesza grupy badawcze we wspólnym projekcie znakowania gatunków ryb na podstawie określonego, silnie zakonserwowanego ewolucyjnie fragmentu DNA [<http://www.fishbol.org/>]. Taka inicjatywa ma na celu utworzenie banku sekwencji DNA służących do oznaczania zagrożonych wyginięciem gatunków ryb dla zachowania bioróżnorodności akwenów. Ponadto określa się przynależność systematyczną osobników wcześniej niesklasyfikowanych dla wypracowania wiarygodnej metody identyfikacji, np. przez uzupełnienie metod identyfikacji na podstawie pokroju ciała. Wysoka homogenność populacji oznacza ryzyko kumulacji alleli zmutowanych lub uszkodzonych. W każdym kolejnym pokoleniu mogłaby rosnąć liczba osobników będących nosicielami takich „niekorzystnych” układów allelicznych.

Należy również zwrócić szczególną uwagę na zapis konwencji, który nakłada na państwa członkowskie obowiązek zachowania różnorodności biologicznej poza granicami obszarów objętych ochroną, wspierania ekosystemów i naturalnych siedlisk, a także utrzymania zdolnych do życia populacji gatunków w ich naturalnym otoczeniu. Wypełnienie tych obowiązków jest możliwe wówczas, gdy gatunek jest genetycznie zdefiniowany, a populacje występujące na danym terenie są rozpoznane pod względem puli genetycznej. Możliwe jest wtedy określenie wspólnego pochodzenia poszczególnych populacji uznanych za jednorodne genetycznie. Taki zakres prac pozwala objąć monitoringiem zagrożone populacje w celu zachowania i utrzymania ich odrębności.

1.1. Charakterystyka gatunku *Vimba vimba*

1.1.1. Gatunek w ujęciu biologicznym

Według Mayra [1942, 1974], biologiczna definicja gatunku odnosi się do grupy naturalnych populacji, które faktycznie lub potencjalnie mogą się krzyżować ze sobą nawet w warunkach istnienia między nimi bariery izolacyjnej, która jest jedną z głównych sił napędowych w ewolucji gatunków. Wynika to z ograniczenia lub zahamowania przepływu genów między populacjami na skutek występowania w ich naturalnym środowisku barier, które uniemożliwiają skuteczne kojarzenie się osobników. Jest również wiele prac ujmujących gatunek w aspekcie ewolucyjnym [Simpson, 1951], filogenetycznym [Cracraft, 1983] lub rozpoznawczym [Paterson, 1985]. W efekcie pierwotna definicja Mayra uległa dość znacznym zmianom, co poskutkowało opublikowaniem w 1982 roku modyfikacji pierwotnej wersji BSC (*Biological Species Concept*), która została w uzupełniona przez Avise i Balla [1990]. Zasugerowali oni sposoby uznawania gatunków na podstawie „dowodów zgodnego rozdziału wielu niezależnych atrybutów genetycznych”.

Inną, nowocześniejszą definicję gatunku sformułował Mayden [2002]. Gatunek określił jako grupę realnie występującą w środowisku, która składa się z osobników różniących się od siebie (mających odrębne cechy), a jednocześnie wyróżniającą się pewnymi grupami cech od innych grup i mającą własne, niezależne dzieje ewolucyjne.

Nelson [1999] uznał za kontrowersyjną biologiczną definicję gatunku. Według niego, termin „gatunek” jest używany w biologii w dwóch znaczeniach: w pierwszym jako jednostka

ewolucyjna, a w drugim jako kategoria w hierarchii linneuszowskiej. Należy zaznaczyć, że w publikacjach dotyczących biologii i taksonomii ryb [Nelson 1994, 2006] gatunkiem, według Nelsona, jest grupa osobników (populacji), które w naturalnych warunkach krzyżują się jedynie między sobą. Mogą to być takie grupy osobników, których linie ewolucyjne nieodwracalnie oddaliły się od siebie w wyniku zmian, jakie zaszły między nimi. Prześledzenie pochodzenia danej grupy ewolucyjnej wraz z określeniem wspólnego przodka wymaga czasochłonnych badań, obejmujących nie tylko morfologię i fizjologię, ale również oznaczenia molekularne i genetyczne danej grupy taksonomicznej.

1.1.2. Status taksonomiczny gatunku *Vimba vimba*

Na podstawie wyznaczników gatunku opracowano system klasyfikacji oparty na filogenetycznym układzie systematycznym [Nelson, 1994], według którego gatunek certy sklasyfikowano następująco:

gromada Actinopterygii,
 podgromada Neopterygii,
 dział Teleostei,
 poddział Euteleostei,
 nadrząd Ostariophysi,
 seria Otophysi,
 rząd Cypriniformes,
 nadrodzina Cyprinoidea,
 rodzina Cyprinidae,
 podrodzina Leuciscinae,
 rodzaj *Vimba* (Linnaeus, 1758), [Nelson, 2006].

Gatunek *Vimba* reprezentowany jest przez ryby o średniej wielkości ciała, zamieszkujące dolne lub środkowe biegi rzek [Kottelat, Freyhof, 2007]. Różnią się one kształtem, ubarwieniem oraz ekologią. W obrębie gatunku opisano populacje semianadromiczne, których zasiedlenie jest niekiedy ograniczone do środkowego biegu rzeki. W składzie tych populacji dominują osobniki niewielkich rozmiarów, natomiast osobniki duże spotykane są tylko sporadycznie. Taka zmienność w obrębie gatunku doprowadziła do opisanie wielu taksonów „poniżej” jego poziomu, które obecnie traktowane są jak synonimy. Tak jest w przypadku subalpejskiej certy, która czasami jest rozpoznawana jako *Vimba elongata* [Kottelat, Freyhof, 2007]. Pewne jej populacje wykazują drobne różnice, na których podstawie mogą być odróżniane od *Vimba vimba*. Jest to prawdopodobnie wynikiem izolacji granicznej, jednak należałoby potwierdzić tę hipotezę przez prześledzenie ich genetycznego zróżnicowania wynikającego ze zmienności środowiskowej.

1.1.3. Wybrane zagadnienia z biologii certy

Certa jest gatunkiem bytującym w słonawych wodach estuariowych oraz w dużych i średnich rzekach, ale spotykana jest również w niektórych dużych jeziorach podalpejskich. Są również populacje osiadłe w małych rzekach reprezentujących krainę brzany [Kottelat, Freyhof, 2007]. Gatunek ten odbywa dwa typy wędrówek: rozrodcze – z morza w górę rzek, oraz żerowiskowe – z rzeki do morza i w granicach tej samej rzeki. Jak podaje Bontemps

[1971], masa ciała osobników certy może osiągać nawet 1 kg, a okres ich życia szacuje się na maksymalnie 15 lat. Według niektórych źródeł dojrzałość płciową osiągają one w wieku 4–5 lat, natomiast Kottelat i Freyhof [2007] twierdzą, że ryby tego gatunku dojrzewają już w trzecim roku życia. Dane te są zgodne z ustaleniami Kleszcza i innych [2001], gdyż większość odłowionych przez nich do sztucznego rozrodu ryb miała co prawda wiek 4+ i 5+, ale złowione w Baryczy tarlaki były również w wieku 3+. Jak wynika z obserwacji Pliszki [1963], dojrzałe osobniki certy w wieku 3+ to tylko samce. Tarło certy ma charakter wielokrotny i wielomiotowy [Bontemps, 1971]. Tarlaki przybywają na tarliska po nastaniu odpowiedniej temperatury (17–18°C) i pozostają tam do połowy maja, a nawet do pierwszych dni lipca [Bontemps, 1960]; w tym czasie temperatura wody na tarliskach może dochodzić nawet do 24°C [Pliszka, 1953]. Rozród certy podobnie opisuje Heese [2000], twierdząc, że tarło ma charakter porcyjny, a rozród u tego gatunku jest rozciągnięty w czasie. Jak jednak wynika z obserwacji ichtologów zajmujących się rozrodem certy (Ośrodek Zarybieniowy w Szczodrem), tarła certy nie można nazwać porcyjnym. Wynika to z obserwacji pozyskiwania ikry od dojrzałych samic do sztucznego rozrodu. Z gonady pozyskuje się 80–90% dojrzałych komórek rozrodczych, a ułamek, który pozostaje w zakamarkach gonady, jest niedostępny, ale również dojrzały. Z tego materiału uzyskuje się 90%, a nawet 100% zapłodnionych ziaren ikry, co oznacza, że gonada dojrzewa w jednym czasie i dlatego takiego charakteru tarła nie można uznać za porcyjny, tak jak to jest np. u brzany. W tym przypadku połowa komórek rozrodczych z gonady dojrzewa po kilku dniach od pozyskania pierwszej partii dojrzałej ikry. Badania nad procesem dojrzewania gonad u certy pochodzącej z Drawieńskiego Parku Narodowego prowadzili Hliwa i inni [2002]. Według tych autorów, gatunek certy charakteryzuje porcyjny charakter tarła, na co wskazuje kompleksowa analiza etapów dojrzewania jajników.

Zagadnienia dotyczące charakterystyki wędrówek certy opisywało wielu badaczy. W latach sześćdziesiątych XX wieku wędrówki w basenie Morza Bałtyckiego przedstawiono na podstawie znakowania ryb lub obserwacji wyników połowu stada tarłowego migrującego w górę rzeki. Skuteczność obu tych metod przedstawił w swojej monografii Bontemps [1971]. Tempo wędrówki stada zależy od wielu czynników biologicznych (średniego wieku wędrującego stada, stanu zdrowotnego ryb, dojrzałości gonad) i środowiskowych (długość okresu zimowego, konieczność przerwania wędrówki lub zmniejszenia jej prędkości).

1.1.4. Zmienność gatunkowa i wewnątrzgatunkowa

W obrębie rodzaju *Vimba* wyróżnia się trzy gatunki: *Vimba vimba* (najszerzej rozpowszechniony), *Vimba elongata* i *Vimba melanops*. Według Heese [2000] w obrębie gatunku *Vimba vimba* wyróżniono pięć podgatunków: *Vimba vimba vimba* – gatunek nominatywny, *Vimba vimba carinata*, *Vimba vimba bergi*, *Vimba vimba persa* i *Vimba vimba tenella*. Różnice w obrębie podgatunków dotyczą bardziej cech biologicznych niż morfologicznych, co jest wynikiem zasiedlenia odrębnych obszarów geograficznych. Za obszar występowania *Vimba vimba vimba* uważa się zlewisko Bałtyku i Morza Północnego, dla podgatunku *Vimba vimba carinata* obszar ten jest ograniczony do zlewiska Morza Czarnego. W tym rejonie zdefiniowano też podgatunek *Vimba vimba bergi*. *Vimba vimba tenella* zasiedla rzeki Krymu, aż po wybrzeże Gruzji, a *Vimba vimba persa* bytuje w zlewisku Morza Kaspijskiego.

Na przykład Kottelat [1997] wymienia osiem form certy w obrębie podgatunku *Vimba vimba tenella*, między którymi jednak nie zawsze można stwierdzić występowanie różnic morfometrycznych. Obecnie wśród systematyków panuje tendencja odchodzenia od nadawania statusu podgatunku, ponieważ często wyznaczniki morfometryczne, które są podstawą do ich rozróżniania, zanikają po przeniesieniu danej formy do innego habitatu. Są to cechy nabyte, nie zawsze dziedziczne, będące wypadkową czynników środowiskowych i czasu ekspozycji ryb na ich działanie [Freyhof, inf. ustna].

Najbardziej specyficzne są stada certy zamieszkujące jeziora podalpejskie. Charakteryzują się one osiąganiem mniejszych rozmiarów osobniczych i składają mniej ikry w porównaniu z certą wędrowną. Bardzo interesującym zjawiskiem występującym w obrębie gatunku *Vimba vimba* jest tworzenie się populacji stacjonarnych, czyli stad. Mają one duże zdolności przystosowawcze i mogą zasiedlać nawet sztuczne akweny, lecz pod warunkiem, że umożliwi im się odbywanie tarła w potokach zasilających te akweny. Z biologicznego punktu widzenia stadem nazywamy ograniczoną liczebnie grupę osobników jednego gatunku, zdolną do reprodukcji i zajmującą wspólny obszar. Skupienia ryb nie tworzą się jednak przypadkowo, lecz wynika to z ich przystosowania do warunków środowiska. Wszelkiego rodzaju stada (tarłowe lub żerujące) mają różnorodny charakter i strukturę [Pliszka 1964]. W konsekwencji tworzenie się stad może wynikać m.in. z reakcji na zróżnicowanie czynników środowiskowych lub występowanie różnic w procesach rozrodczych. Według Oduma [1963], formowanie się stad wynika prawdopodobnie z potrzeby ochrony populacji przed wrogami i czynnikami uznanymi za niebezpieczne, strategii poszukiwania pokarmu, zimowania, rozrodu lub podejmowania innych wędrówek. Jednak, jak podaje Opuszyński [1983], w skład stada (lub populacji) wchodzi osobniki jednego gatunku, które reprezentują zróżnicowaną strukturę wiekową. Takie stado ma zdolności samoodnawiania, a dopływ genów z innych populacji jest dość mocno ograniczony. Ciekawe jest również stwierdzenie tego autora, że populacje nie muszą różnić się zauważalnymi cechami morfologicznymi poszczególnych osobników. Tworzą one jednostki, które można scharakteryzować na podstawie cech „zbiorczych”, czyli przykładowo struktury wiekowej, liczebności lub płodności populacyjnej.

Nelson [1999] definiuje podgatunek jako kategorię systematyczną, obejmującą zespół populacji lokalnych danego gatunku, zajmujących wyodrębniony obszar w zasięgu występowania gatunku. Podgatunki różnią się cechami taksonomicznymi i pewnymi właściwościami puli genów. Termin ten często jest jednak używany w takim samym znaczeniu jak rasa. W obrębie podgatunku *Vimba vimba vimba* wyróżniono dwie rasy: *Vimba vimba vimba carinata* (rybiec) – ograniczoną zasięgiem do basenu Morza Czarnego, oraz *Vimba vimba vimba natio bergi* (rybiec łobacz) – występującą w rzece Boh na Ukrainie [Bănărescu, 1971].

Wielu badaczy zajmujących się biologią ryb dwuśrodowiskowych również wyodrębniła różne formy certy ze zlewiska Morza Bałtyckiego. Są to taksony poniżej podgatunku, które różnią się od formy podstawowej innym okresem tarła lub wędrówek. W ten sposób wyróżniono wędrowną i stacjonarną formę certy, formę „chudą” i „dużą”, czarną” i „białą” [Bontemps, 1971]. Bontemps [1969] także opisuje potencjalną możliwość tworzenia stad lokalnych przez certy z Sanu, które w ogóle nie opuszczają swoich tarlisk. Należy jednak zwrócić uwagę na płynną granicę między podgatunkiem a formą lub rasą. Jest to problem nie tylko

taksonomiczny, ale również genetyczny. Nie ma bowiem żadnej jasnej i powszechnie używanej definicji, która jednoznacznie wskazywałaby na moment przejścia od stada do rasy lub od rasy do podgatunku. Jest to związane z istnieniem naturalnych różnic na poziomie międzyosobniczym oraz międzypopulacyjnym, co jest szczególnie widoczne w przypadku gatunków dwuśrodowiskowych, do których należy certa. Plastyczność pewnych cech jest wynikiem adaptacji do warunków środowiskowych, czyli procesu niezbędnego do utrzymania ciągłości gatunkowej. W tworzeniu form lokalnych certy bardzo ważną rolę odegrała zabudowa hydrotechniczna rzek. Budowa zapory we Włocławku bezsprzecznie przyczyniła się do ograniczenia certom możliwości rozrodu, ponieważ uniemożliwiła im naturalną migrację [Witkowski i inni, 2004]. Wobec tego w Wiśle powstało stado certy, które rozradza się tylko w jej górnym biegu. Bartel [2002] jako przyczynę ekstynkcji certy w połowach podał właśnie przegrodzenie Wisły. Autor ten uważa również, że było to bezpośrednią przyczyną zlikwidowania dawnej tarłowej populacji certy. Podobną sytuację cert z rzeki Orawy przedstawia Wajdowicz [1967]. Po zamknięciu doliny zaporą i utworzeniu Zbiornika Orawskiego pozostawiono stado cert, któremu odcięto drogę do miejsca ich bytowania. Zmusiło to tak nieliczne osobniki certy do przystosowania się do nowych warunków bytowania praktycznie w wodzie stojącej.

Badania nad określeniem zmienności populacyjnej w obrębie gatunku *Vimba vimba* prowadzono w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku [Bănărescu i inni, 1970; Payusova i inni 1976]. Analiza czterech populacji z różnych stanowisk ich występowania, oparta na charakterystyce cech cytofizjologicznych i biochemicznych, wskazała na występowanie różnic międzypopulacyjnych. Payusova i inni [1976] podają dwa możliwe źródła tych zmian. Pierwszym jest polimorfizm (zmienność genetyczna), będący naturalnym zjawiskiem w izolowanych od siebie populacjach, a drugie źródło to wykształcenie się tzw. *sibling species* (gatunków siostrzanych), występujących na „nakładających się” obszarach występowania. Pojawianie się terminu „gatunek siostrzany” po raz kolejny świadczy o braku jednoznacznego określenia różnicy między taksonami zarówno w obrębie gatunku biologicznego jak i poniżej. W nomenklaturze zoologicznej [Mayr i Ashlock, 1991] znajduje się pojęcie gatunków bliźniaczych, zdefiniowane jako gatunki identyczne lub bardzo pokrewne pod względem morfologicznym, ale bez możliwości krzyżowania się (tzn. nie zachodzi wtedy wymiana puli genowej). Obecność bariery rozrodowej, a jednocześnie brak możliwości rozróżnienia tych gatunków, zwanych też kryptycznymi, tylko na podstawie wyglądu zewnętrznego bardzo utrudnia ich identyfikację.

Bănărescu i inni [1970] opisują różnice morfologiczne między podgatunkami *Vimba vimba tenella* i *Vimba vimba carinata*, które są zdecydowanie wyraźniejsze niż różnice anatomiczne. Takie cechy, jak liczba kręgów czy liczba wyrostków skrzelowych zostały określone jako cechy różnicujące oba wymienione podgatunki certy, w przeciwieństwie do kształtu i zagęszczenia zębów gardłowych. Według cytowanych autorów, cecha ta okazała się mniej uwydatniona. Begdon [1976] wskazuje na możliwości różnicowania morfologicznego podgatunku *Vimba vimba persa* zasiedlającego zlewisko Morza Kaspijskiego oraz *Vimba vimba tenella*, którego zasięg ogranicza się do zlewiska Morza Czarnego. Pierwszy podgatunek charakteryzuje się małą liczbą łusek w linii bocznej, drugi jest określany jako forma drobna – dorasta maksymalnie do 18,8 cm. Ten sam autor przedstawia również klucz do oznaczania

morfolożicznego r33nych form certy. S33 to formy: wysokogrzebietowa *Vimba vimba vimba natio carinata*, zwana r33wnieŹ „płask33”, oraz niskogrzebietowa o nazwie *Vimba vimba vimba natio bergi*.

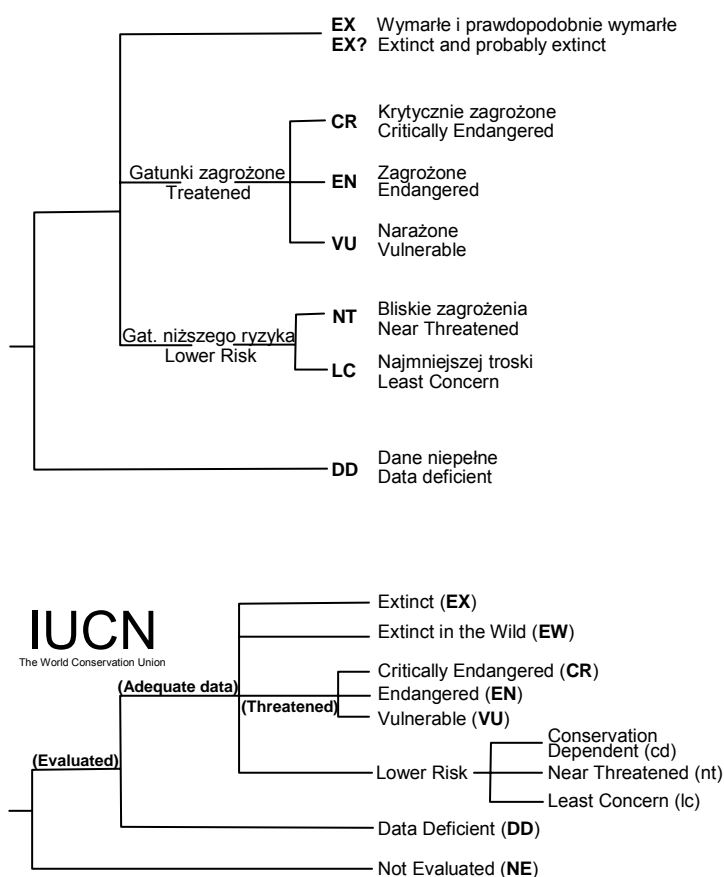
Wyr33żnienie form certy w zaleŹnoŹci od zlewni jest r33wnieŹ cz33sto spotykane w pracach selekcyjno-populacyjnych. Badania nad zr33nicowaniem genetycznym certy wyst33puj33cej w zlewni Wisły oraz Odry prowadziła Trojnicka-Szczepańska [2005] w ramach przygotowania bazy danych dla programu reintrodukcji certy do rzek Polski. Autorka ta okreŹliła poziom zmiennoŹci genetycznej i zr33nicowanie wybranych populacji *Vimba vimba* oraz przedstawiła analiz33 powi33zań filogenetycznych mi33dzy poszczeg33lnymi populacjami, wykorzystuj33c molekularne markery genetyczne. Stwierdziła, Źe certy, kt33re zasiedlaj33 obecnie zlewnie Wisły i Odry, prawdopodobnie naleŹ33 do jednej linii ewolucyjnej. S33 one jednak zr33nicowane w obr33bie mtDNA i wiele z nich ma haplotypy „prywatne”, czyli takie, kt33rych nie stwierdzono w pozostałych populacjach.

1.1.5. Spadek liczebnoŹci i ochrona gatunku

Kottelat i Freyhof [2007] kategoryzuj33 gatunek *Vimba vimba* jako *least concern* (LC), czyli „gatunek najmniejszej troski” lub „gatunek niŹszego ryzyka”. Do tej grupy przynaleŹ33 taksony, kt33re jeszcze nie kwalifikuj33 si33 do miana gatunku krytycznie zagroŹonego, zagroŹonego lub b33d33cego na wygini33ciu. Drugi gatunek wyst33puj33cy w wodach Europy (*Vimba melanops*) został sklasyfikowany przez Crivelli [2006] jako niekompletnie zdefiniowany (*data deficient* – DD). Status ten nadawany jest taksonom, o kt33rych nie ma informacji niezb33dnych do przeprowadzenia poŹredniej lub bezpoŹredniej oceny stopnia zagroŹenia wygini33ciem. Status taki przyznawany jest na podstawie rozmieszczenia i/lub oceny stabilnoŹci populacji. Poszczeg33lne kategorie okreŹlaj33c stopień zagroŹenia danego gatunku (rys. 1) oraz status zagroŹenia certy *Vimba vimba* w wybranych krajach europejskich przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Status zagroŹenia dla certy w krajach, z kt33rych pochodz33 pr33by obj33te badaniami

Lp.	Kraj	Status	Opis	Referencje
1.	Polska	CR – critically endangered	krytycznie zagroŹone	Witkowski i in., 2009
2.	Niemcy	EN – endangered	zagroŹone	Freyhof, 2009
3.	Słowenia	EN – endangered	zagroŹone	inf. ustna – Meta Povz
4.	Czechy	VU – vulnerable	naraŹone	Lusk i inni, 2004
5.	Austria	VU – vulnerable	naraŹone	Wolfram i Mikschi, 2001
6.	Turcja	LC – last concern	najmniejszej troski	inf. ustna – Oguz Tasbozan
7.	Estonia	DD – data defficient	nieokreŹlony stopień zagroŹenia	Estonian Red Data Book, 2007
8.	Litwa	nieuj33ty na liŹcie	–	The Red List of Lithuania, 2007



Rys. 1. Kategorie gatunków pod względem zagrożenia i uznanych za wymarłe stosowane w „Czerwonej liście zwierząt ginących i zagrożonych w Polsce” [Głowaciński, 2002] – u góry oraz wymienione w „1996 IUCN Red List of Threatened Animals” – u dołu

Bardzo gwałtowny spadek liczebności certy w Polsce przyczynił się do podjęcia działań na rzecz ochrony tego gatunku. Pierwsze dane, obejmujące statystyki połowowe, można odnaleźć w pracy Bontempsa [1955]. Z 342,5 t certy odłowionej w Polsce w 1953 roku wartość ta spadła do 268,5 t w 1954 roku i 176,9 t w 1955 roku. Rok później ilość odłowionych cert w wodach Zalewu Wiślanego, Wisły, Zatoki Gdańskiej, Zatoki Pomorskiej, Zalewu Szczecińskiego i Odry (wraz z Wartą) wzrosła nieznacznie, bo do 207,3 t. Jak podaje Wiśniewolski [2007], po przegrodzeniu rzeki zaporą w 1968 roku anadromiczna populacja certy wiślanej znalazła się na granicy zagłady, a jednocześnie ustępowanie certy z Odry spowodowało zaklasyfikowanie tego gatunku do grupy krytycznie zagrożonych. Autor ten zwrócił również uwagę na inne, kompleksowo oddziałujące przyczyny spadku liczebności certy, do których zaliczył: zanieczyszczenie wód w dorzeczu Odry i Wisły, odcięcie, dewastację i zamulanie tarlisk, nadmierne połowy oraz brak akcji zarybieniowych. Można uznać, że obecnie gatunek ten zniknął z połowów lub jest traktowany jako przyłów i nie podlega żadnym statystykom rybackim. W roku 1981 *Vimba vimba* została wpisana do Czerwonej księgi, co pozwoliło na rozpoczęcie prac nad restytucją tego gatunku. Witkowski i inni [2004] podjęli próbę określenia dawnego zasięgu certy w dorzeczu Odry, lokalizacji tarlisk i analizy przyczyn zaniku tego gatunku w połowach od 1974 roku. Zainicjowanie prac hodowlanych oraz ciągle zasilanie bardzo nielicznych populacji jest niezbędne, jeśli gatunek ten ma pozostać

w polskich wodach [Witkowski i inni, 2001]. Heese [2000] zwrócił szczególną uwagę na redukcję zasięgu występowania certy w dorzeczu Wisły i Odry, który został ograniczony do bardzo niewielkich odcinków rzek. Powstały dwa programy restytucji, osobno dla Wisły i Odry. W programie dla dorzecza Odry, opracowanym na podstawie projektu restytucji ryb wędrownych w Polsce przez Sycha [1996], założono przywrócenie w polskich rzekach jesiotra zachodniego, łososia, troci wędrownej i certy. W latach 1999–2000 podjęto próbę produkcji materiału zarybieniowego i restytucji certy w środkowym dorzeczu Odry [Kleszcz i inni, 2001], opierając się na produktach płciowych pozyskanych od tarlaków odłowionych w Baryczy i Płocicznej. Prace nad kontrolowanym rozrodem certy w dorzeczu Odry, prowadzone przez Kleszcza i Wolnickiego [2002], zakładały, że tarlaki po pozyskaniu gamet ponownie zostaną wpuszczane do macierzystej rzeki.

W tabeli 2 zestawiono wielkości zarybień certą w dorzeczu Odry w latach 2000–2003. Jak wynika z podanych wielkości, materiał wyprodukowany i wsiedlany od 2000 roku powinien już wrócić na tarło do rzek, do których został wypuszczony. Tu pojawia się pytanie: czy tak jest w rzeczywistości? Odpowiedź pozwoliłaby ocenić stopień efektywności akcji zarybieniowych. Analizując przedstawione dane, można zauważyć, że ilość i asortyment materiału mocno się między sobą różniły w poszczególnych latach.

Niestabilność zarybień pod względem jakościowym i ilościowym ma niewątpliwie wpływ na ich efekty. Nie znamy też odpowiedzi na pytanie, czy wpuszczana do rzek ilość materiału zarybieniowego jest wystarczająca dla zachowania stabilności populacji certy odrzańskiej. W tym celu trzeba wykonać symulację struktury obecnej i „poprzedniej” populacji w aspekcie jej stabilności ilościowej i jakościowej.

Mniej zaawansowany program restytucji wdrożano w dorzeczu Wisły. Był on oparty na pozyskiwaniu osobników z populacji wędrownej certy z podkarpackich tarlisk, a następnie podchowcie materiału zarybieniowego. Taki system miał na celu doraźne podtrzymanie wędrownego stada certy w dorzeczu Wisły [Witkowski i inni, 2004]. Według danych Bartla (niepublikowanych), program restytucji certy w dopływach środkowej Odry rozpoczął się w 2000 roku, w Odrze i Redze – w 2004 roku, a w Inie i Wiśle – dopiero w 2007 roku. Planowane efekty obu programów, ze względu na późny okres dojrzewania certy, będą widoczne po 7–10 latach od czasu rozpoczęcia systematycznych zarybień. Wiśniewolski i inni [2004] zwrócili jednak szczególną uwagę na konieczność kontroli genetycznej materiału zarybieniowego przez jego porównanie z populacjami certy (nawet szczątkowymi) egzystującymi w określonych rejonach geograficznych. Jest to istotne przy doborze ośrodka zarybieniowego mającego określone stado tarlaków. Pula genowa tego stada powinna być najbardziej zbliżona do puli genowej osobników certy tego odcinka dorzecza, do którego materiał ma być wsiedlony. W przypadku braku kontroli tzw. czystości populacyjnej może się okazać, że wsiedlany materiał jest tak odmienny genetycznie, że zamiast integracji z naturalnym pogłowiem certy dojdzie do izolacji stada, co dla utrzymania odpowiedniej liczebności populacji jest zjawiskiem bardzo niekorzystnym. Dane przedstawiające wielkość zarybień certą zlewni Wisły w latach 2000–2003 zestawiono w tabeli 3. Rzekę tę zarybiano głównie wylęgiem i narybkiem letnim, natomiast w latach 2002 i 2003 nie prowadzono zarybień.

Tabela 2. Wielkości zarybień certą w dorzeczu Odry w latach 2000–2003 (Zarząd Główny PZW, dane niepublikowane)

Rok	Rodzaj materiału zarybieniowego	Średzka Woda	Barycz	Widawa	Kaczawa	Noteć	Flinta	Obrzyca	Pliszka	Gwda	Płociczna*	Prosna	Razem
2000	wylęg podchowany	–	–	–	–	–	–	–	–	–	12 000	–	12 000
	narybek jesienny	–	250 000	15 000	2600	–	–	–	–	–	300	–	267 900
Razem		0	250 000	15 000	2600	0	0	0	0	0	12 300	0	279 900
2001	wylęg podchowany	–	–	–	–	–	–	–	–	–	57 000	–	57 000
	narybek letni	–	201 524	–	–	–	–	–	–	20 000	–	11 400	232 924
	narybek jesienny	66 500	252 000	7153	–	–	–	–	–	–	–	–	325 653
Razem		66 500	453524	7153	0	0	0	0	0	20 000	57 000	11 400	615 577
2002	wylęg podchowany	–	–	50 000	–	–	–	–	–	–	–	–	50 000
	narybek letni	–	102 000	38 000	–	–	–	–	–	–	–	–	140 000
	narybek jesienny	–	85 000	–	10 000	22 500	2500	–	–	10 000	–	10 000	140 000
Razem		0	187 000	88 000	10 000	22 500	2500	0	0	10 000	0	10 000	330 000
2003	wylęg podchowany	–	180 000	–	–	–	–	–	–	–	–	–	180 000
	narybek letni	–	57 000	30 000	–	–	–	–	–	–	–	44 000	131 000
	narybek jesienny	10 000	40 400	–	14 600	12 000	–	12 000	8000	13 000	–	–	110 000
	dwulatki	–	1007	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1007
Razem		10 000	278 407	30 000	14 600	12 000	0	12 000	8000	13 000	0	44 000	422 007
Ogółem		76 500	1 168 931	140 153	27 200	34 500	2500	12 000	8000	43 000	69 300	65 400	164 7484
%		4,6	71,0	8,5	1,7	2,1	0,2	0,7	0,5	2,6	4,2	4,0	

* Materiał zarybieniowy certy rezydentalnej [Hliwa, 2001].

Tabela 3. Wielkość zarybień certą zlewni Wisły w latach 2000–2003 [Mielcarski, Zarząd Główny PZW, dane niepublikowane]

Rok	Rodzaj materiału zarybieniowego	Miejsce zarybienia	Ilość [szt.]
2000	wylęg/narybek letni	Olsztyn	1100
	narybek	Olsztyn	11 300
2001	wylęg/narybek letni	Łomża, Olsztyn	55 000
2002	brak zarybień		
2003	brak zarybień		

1.2. Metody genetyczne wykorzystywane w badaniach populacyjnych ryb ze szczególnym uwzględnieniem analizy cytochromu b (cyt. b)

Genetyka populacyjna jest jedną z wielu dziedzin genetyki, która w ostatnich czasach rozwija się bardzo dynamicznie. Wykorzystuje się w niej nowe techniki molekularne i cytogenetyczne, pozwalające na określanie zmienności genetycznej nie tylko między różnymi populacjami, ale także różnic międzyosobniczych, ułatwiających systematyzowanie grup lokalnych zwierząt w stada, rasy lub linie. W przypadku ryb ma to szczególne znaczenie. Można bowiem dzisiaj badać zależności filogenetyczne między grupami ryb i opisywać gatunki zarówno bardzo stare, żyjące na ziemi od setek milionów lat (np. Chondrostei), jak i te, które wykształciły się zupełnie niedawno (np. z rzędu Perciformes). Oznacza to, że mamy do dyspozycji zarówno bardzo zakonserwowane układy genów, jak i „świeże”, które pozwalają uchwycić nie tylko tempo zmian w obrębie genomu gromady ryb, ale także określić kierunek ich ewolucji.

Obecnie bardzo szeroko wykorzystywane są badania cytogenetyczne, czyli takie, w których materiałem do analizy populacji są chromosomy ryb. Wielu badaczy, analizując liczbę i morfologię chromosomów, określa zróżnicowanie między gatunkami bardzo podobnymi morfologicznie, a także określa tzw. chromosomy markerowe dla poszczególnych populacji. Badania Boroń [2001], prowadzone na rybach z rodzaju *Cobitis*, wskazują na możliwość wykorzystania wzorów chromosomowych do opisanego procesu powstawania form poliploidalnych u ryb. Autorka ta opisała bardzo interesujące zjawisko, polegające na występowaniu w komórkach (narządach, tkankach) ryb różnej liczby chromosomów (tzw. formy mozaikowate). Jest to bardzo istotne dla badań taksonomicznych ryb, ponieważ liczba chromosomów tworząca tzw. kariotyp jest ważną cechą cytotaksonomiczną. Na podstawie liczby par chromosomów homologicznych w komórkach ustala się również przynależność gatunkową ryb. Bardzo ważną rolę odgrywają tzw. chromosomy markerowe, czyli takie, które wykazują cechy specyficzne, pozwalające określić przynależność do grup taksonomicznych poniżej gatunku biologicznego. Do takich cech zaliczamy np. obecność obszarów jąderkotwórczych (NOR – *nucleus organizer region*), czyli tzw. przewężeń wtórnych, obecnych tylko na niektórych chromosomach. Jankun [2001] do tworzenia map cytogenetycznych dla ryb z rodzaju *Coregonus* wykorzystuje lokalizację obszarów organizujących jąderka (NOR) celem określe-

nia tempa i kierunku ewolucji sekwencji u wybranych gatunków. Autorka ustalając lokalizację NOR na trzech chromosomach (9, 10 i 11) zawsze obecnych w komórkach siei, sielawy i pelugi, proponuje zakwalifikować te cechy jako marker dla ryb z rodzaju *Coregonus*, odziedziczony po najbliższym wspólnym przodku. Badania na poziomie chromosomów w istotny sposób uzupełniają charakterystykę morfologiczną lub biometryczną poszczególnych gatunków czy populacji ryb. W Czechach od lat prowadzone są prace nad optymalizacją metod analizy chromosomów u ryb. Badania w obrębie rodzaju *Vimba* [Rabova i inni, 2003] przyczyniły się do ustalenia homogenności cytogenetycznej między podgatunkami *Vimba vimba* i *Vimba elongata*, pochodzącymi z rzek na terenie Czech i Niemiec. Diploidalny garnitur chromosomów dla certy (*Vimba vimba*) po raz pierwszy opisała Rudek [1974]. Badania wykonano na osobnikach pochodzących z wylęgarni ryb w Goleniowie. Tarlaki certy pochodziły z rejonu Morza Bałtyckiego, do badań zaś wykorzystano śledzionę, jelito i skórę. Na materiale tym po raz pierwszy w Polsce ustalono diploidalny garnitur chromosomowy dla gatunku *Vimba vimba vimba* L. Wynosi on $2n = 50$, przy czym przynależność chromosomową poszczególnych par ustalano na podstawie systemu identyfikacji chromosomów opracowanego przez Levana. Na tym samym materiale Rudek [1974] ustaliła również system determinacji płci u certy (samice XX, samce XY).

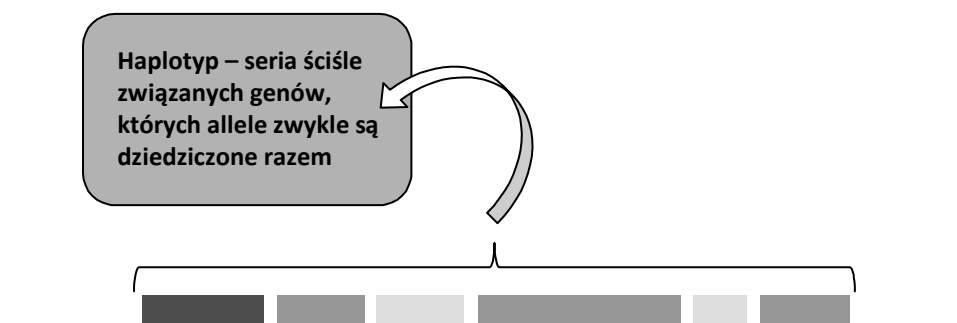
Ograniczeniem w badaniach cytogenetycznych jest konieczność dostępu do żywego materiału, co w przypadku porównywania populacji z odległych rejonów geograficznym jest utrudnieniem, ponieważ transport żywych ryb z dalekich regionów jest czasami niemożliwy. Ograniczenia te dotyczą również gatunku będącego przedmiotem niniejszej pracy, ponieważ, jak powszechnie wiadomo, certy jest gatunkiem bardzo wrażliwym zarówno na transport, jak i na wszelkiego rodzaju manipulacje. Biorąc pod uwagę konieczność uchwycenia podziałów komórkowych w stadium metafazy (tylko w tym momencie podczas całego cyklu życia komórki uwidocznione są chromosomy), u ryb stosuje się tzw. kolchicynowanie, co znacznie zwiększa liczbę możliwych do uchwycenia metafaz. Wynika to z tego, że kolchicina (pozyskiwana z nasion ziemowita jesiennego – *Colchicum autumnale*) jest związkami z grupy alkaloidów, który zatrzymuje podział komórki właśnie w stadium metafazy, gdyż wpływa na zahamowanie formowania się wrzeciona kariokinetycznego, co uniemożliwia rozejście się chromosomów. Dużym ograniczeniem jest również wielkość chromosomów (2–5 μm), która powoduje, że analiza obrazu jest bardziej pracochłonna niż na przykład u płazów, mających chromosomy o wielkości nawet 60 μm [Jankun, 2004].

Wykorzystanie badań cytogenetycznych do oceny stabilności populacji ryb jest niewątpliwie bardzo istotne, gdyż umożliwiają one identyfikację chromosomów markerowych, charakterystycznych nie tylko dla danego gatunku, ale również dla poszczególnych osobników. W akwakulturze metodą tą można również oznaczyć hybrydy lub potwierdzić obecność w populacji osobników o zwielokrotnionym garniturze chromosomowym. Jest ona skuteczna w ocenie genotoksycznego działania niektórych związków, takich jak na przykład zieleń malachitowa, która w akwakulturze jeszcze do niedawna była dopuszczona jako środek ochrony ryb przed pasożytami zewnętrznymi [Kempster i inni, 2004].

Inną metodą, coraz częściej stosowaną, polegającą na analizie produktu (wyizolowanego DNA) po reakcji PCR, jest *analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych*

(PCR-RFLP). Polega ona na powieleniu fragmentu poszukiwanego genu do kilku tysięcy kopii poza organizmem żywym. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu pary komplementarnych starterów reakcji, czyli krótkich fragmentów nukleotydowych, syntetycznie pozyskanych, których sekwencja jest skonstruowana na podstawie sekwencji amplifikowanego genu. W metodzie RFLP jako narzędzie do analizy fragmentu amplifikowanego genu wykorzystuje się enzymy restrykcyjne, które mają możliwość cięcia DNA na fragmenty w ściśle określonych, specyficznych miejscach. Otrzymane po trawieniu fragmenty są rozdzielane na żelu, dając wzór prążkowy (restryktrogram), charakteryzujący danego osobnika. W ten sposób możliwe jest wykrycie substytucji, czyli mutacji punktowych, polegających na wymianie poszczególnych nukleotydów we fragmencie analizowanego genu. Każdy analizowany osobnik (próba), u którego zaszła mutacja, jest oznaczony innym niż większość osobników w badanej populacji wzorem restrykcyjnym, co będzie podstawą do sekwencjonowania tego wariantu genu. Wykorzystanie metody PCR-RFLP w ichtiologii jest coraz powszechniejsze [Brzuzan, 1996; Aranishi i inni, 2005; Akasaki i inni, 2006] ze względu na jej czułość oraz ilość potrzebnego materiału wyjściowego (wystarczy skuteczne wyizolowanie jednej kopii DNA).

Chcąc uzyskać dane dotyczące zmienności międzypopulacyjnej na poziomie struktury genu, coraz częściej wykonuje się sekwencjonowanie pozyskanych fragmentów. Metoda ta pozwala określić kolejność nukleotydów w badanym fragmencie DNA [Słomski, 2004]. Na podstawie badań reprezentatywnej liczby osobników danej populacji ustalane są sekwencje materiału genetycznego organizmów modelowych, co pozwala na poznanie struktury i funkcji kwasu deoksyrybonukleinowego, który dla genetyków jest nadal zbyt mało znany. Na podstawie sekwencji poszczególnych gatunków lub populacji skonstruowano bazę danych (NCBI), w której opublikowano wszystkie dotychczas pozyskane sekwencje. W przypadku ryb baza ta jest źródłem informacji pozwalającej porównać otrzymane dane z danymi dla tego samego gatunku bez konieczności pozyskiwania materiału biologicznego z odległych geograficznie rejonów (łowisk). W latach 2002–2004 przeprowadzono analizę restrykcyjną dla wybranych, polskich populacji siei (*Coregonus lavaretus*), analizując fragment genu ND-1, na którego podstawie scharakteryzowano dziewięć haplotypów w obrębie gatunku [Kohlmann i inni, 2005]. Analiza pozyskanych restryktrogramów pozwoliła na ocenę stanu czystości gatunkowej siei pochodzących z ośmiu jezior położonych na terenie Polski Północnej. Ustalenie haplotypów, czyli wzorów restrykcyjnych, z wykorzystaniem od kilku do kilkunastu enzymów restrykcyjnych jest narzędziem powszechnie stosowanym do określenia zróżnicowania wewnątrzgatunkowego ryb [Jurczyk i Brzuzan, 2004; Kapusta i Ciesielski, 2004]. Koniecznym elementem, gwarantującym poprawne określenie odrębności pozyskanych haplotypów, jest poddanie ich „przedstawicieli” sekwencjonowaniu. Daje to wówczas pewność, że otrzymane po trawieniu produkty są elementami składowymi wcześniej powielonego genu. Według Browna [2001] nieprawidłowo, często zamiennie są używane określenia „allel” i „haplotyp”. Wynika to z tego, że allel jest formą sekwencji pojedynczego genu, haplotyp zaś zbiorem alleli z różnych genów, które bardzo często są wspólnie dziedziczone z powodu bliskiego położenia na nici DNA (rys. 2).



Rys. 2. Graficzne zdefiniowanie haplotypu [według Browna, 2001]

1.2.1. Analiza genu cytochromu b

Na szczególną uwagę zasługuje metoda analizy sekwencji genu odpowiedzialnego za syntezę cytochromów w komórce. Cytochromy są to białka zawierające hem jako grupę prostetyczną, które funkcjonują jako przenośniki jednoelektronowe, łatwo ulegające utlenianiu i redukcji.

Cytochrom b (cyt. b), (reduktaza ubichinol-cytochrom-c), występuje w mitochondriach zwierząt, roślin i drożdży: cyt. b₁ – u bakterii, b₂ – u drożdży, b₃ – w mikrosomach niefotosyntetyzujących roślin, b₅ – w mikrosomach komórek zwierzęcych, b₆ i b₇ – u roślin [Roźniatowski, 1981].

Z powodu obecności żelaza cytochromy mają brązową barwę, stąd ich nazwa po grecku *chroma* oznacza kolor, dawniej były nazywane także heminami komórkowymi [Minkowski, Weidner, 1998]. Przypuszcza się, że pierwszy cytochrom powstał około dwóch milionów lat temu, a geny, które są odpowiedzialne za kodowanie białek cytochromu, od tego czasu były powolnie modyfikowane. Cytochromy to pierwsza grupa białek, dzięki którym sekwencja aminokwasów pozwoliła na skonstruowanie drzewa ewolucyjnego [King i inni, 2006]. Obecnie badania nad zmiennością w obrębie genu odpowiedzialnego za syntezę cytochromu b u ryb są wykorzystywane przede wszystkim do szacowania ich powiązań filogenetycznych [Hsieh i Hwang, 2004; Kartavtsev i inni, 2007], badania żywności przetworzonej pod kątem zawartości deklarowanego na opakowaniu gatunku ryby [Pancorbo i inni, 2004, Akasaki i inni, 2006, Pepe i inni, 2007], identyfikacji gatunków [Parson i inni, 2000, Prusak, Grzybowski, 2004] lub określania pochodzenia śladów biologicznych zwierząt i ludzi [Prusak i inni, 2005].

Określając zależność filogenetyczną u ryb, analizę sekwencji cyt. b wykorzystuje się głównie do uzupełnienia danych morfologicznych [Cunha i inni, 2002] lub do oceny stopnia pokrewieństwa między poszczególnymi grupami ryb, których występowanie jest ograniczone do wąskiego rejonu geograficznego [Freyhof i inni, 2005]. W badaniach zmienności na poziomie międzygatunkowym definiowano gatunki morszczuków wprowadzanych na teren

Czech [Hubalkova i inni, 2009] i węgorzy szklistych, których cena rynkowa w zależności od gatunku jest mocno zróżnicowana [Trautner, 2006].

Zmienność w obrębie gatunku analizowana na podstawie sekwencji genu cyt. b była przedmiotem badań Chenga i innych [2008]. Dokonując analizy nukleotydowej fragmentu genu cyt. b, ocenili zmienność trzech populacji w obrębie gatunku *Coilia mystus* (przedstawiciel rodziny śledziokształtnych). Populacje reprezentowały ryby zasiedlające odizolowane wody estuariowe na terenie Chin. Obecnie coraz częściej podejmowane są próby oceny stabilności genetycznej ryb dzikich i hodowlanych reprezentujących ten sam gatunek [Kubota i Watanabe, 2003]. Wykorzystanie genu cyt. b [Watanabe i inni, 2009] pozwoliło na ocenę struktury dzikich i zagrożonych populacji ryb słodkowodnych, które dla ich odtworzenia były przetrzymywane w zamknięciu. Wymienione możliwości, które daje uliniowana sekwencja genu, odpowiedzialnego za syntezę cytochromów w komórce, pozwalają sądzić, że ten rejon DNA jest właściwą częścią genomu, umożliwiającą prowadzenie badań na poziomie gatunku, populacji i genu u ryb [Kartavtsev i Lee, 2006].

Mając do dyspozycji opisany warsztat badawczy stosowany w ichtiologii, można stwierdzić, że oprócz metod biometrycznych czy morfometrycznych jest wiele narzędzi pozwalających określić status gatunkowy ryb z uwzględnieniem zróżnicowania w obrębie badanego gatunku lub populacji. Ze względu na fakt, że cytochrom powstał około dwóch milionów lat temu, a geny, które są odpowiedzialne za kodowanie białek cytochromu od tego czasu były powolnie modyfikowane, właśnie te białka posłużyły do skonstruowania pierwszego drzewa ewolucyjnego [King i inni, 2006]. Potwierdzona skuteczność i możliwość wykorzystania w genetyce populacyjnej ryb analizy sekwencji genu cyt. b [Kartavtsev i Lee, 2006] skłoniła autorkę do wyboru właśnie tej metody badawczej w niniejszej pracy.

2. Cel pracy

Certa, będąca jednym z gatunków ujętych w krajowym programie restytucji ryb dwuśrodowiskowych, wymaga stworzenia genetycznej bazy danych. Umożliwi ona identyfikowanie poszczególnych populacji i pozwoli na analizę porównawczą populacji z odległych rejonów geograficznych, ze szczególnym uwzględnieniem ich wzajemnych relacji filogenetycznych.

Mając na względzie konieczność ochrony gatunku *Vimba vimba*, jako główne zadania pracy przyjęto:

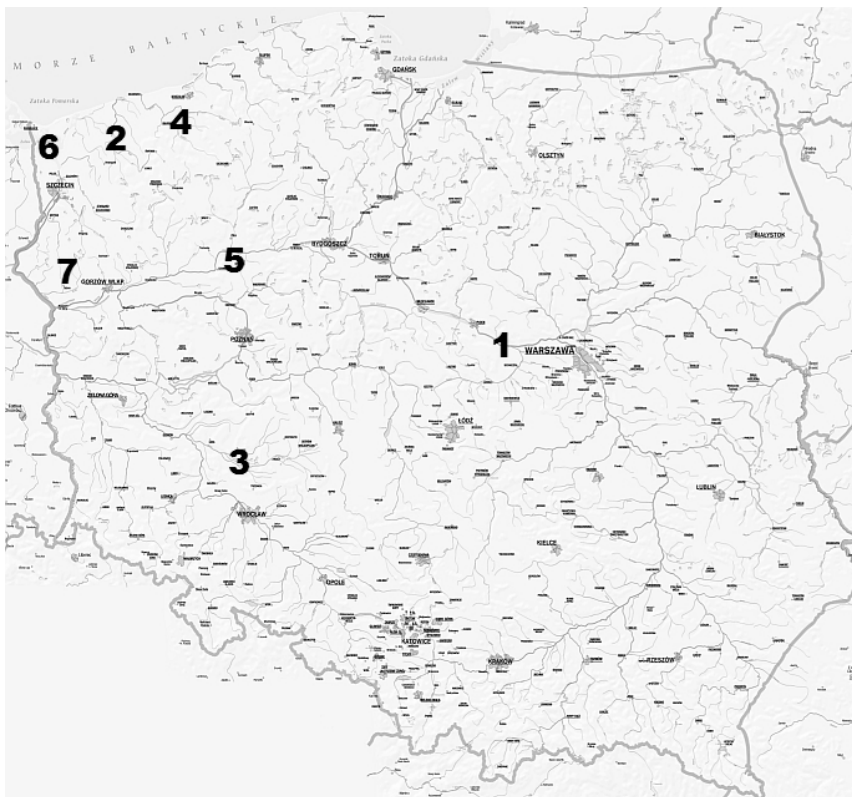
- określenie i scharakteryzowanie haplotypów wybranych populacji certy poprzez analizę restrykcyjną,
- oszacowanie dywergencji między poszczególnymi populacjami na podstawie analizy sekwencji fragmentu genu cyt. b,
- wskazanie fragmentu genu cyt. b przydatnego w konstrukcji primerów do rozróżniania poszczególnych populacji certy,
- ustalenie poziomu różnorodności biologicznej badanych populacji certy w kontekście ich przydatności do utworzenia stada tarłowego i wykorzystania jako żywego banku genów,
- wskazanie populacji z terenu objętego badaniami, które mogłyby być potencjalnym źródłem pozyskiwania tarlaków do utworzenia stabilnego genetycznie stada tarłowego.

3. Materiał i metody

3.1. Ryby

Ryby do badań (tab. 4) pochodziły z 16 stanowisk. Polskie wody reprezentowane były przez certy pochodzące z Wisły, Regi, Baryczy, Parsęty, Noteci, Zalewu Szczecińskiego i Jeziora Ostrowieckiego (rys. 3a). Osobniki tego gatunku, pochodzące z pozostałych krajów europejskich (rys. 3b), pozyskano z rzeki Jihlavy (Czechy), jeziora Traunsee (Austria), rzek Dunaj i Eder (Niemcy), Morza Bałtyckiego – Zalew Kuroński (Litwa), rzek Kolpy (Słowenia), Büyük Menderes (Turcja) oraz Purity (Estonia). Łącznie do analizy genetycznej wykorzystano DNA wyizolowane ze 137 osobników pochodzących z 16 miejsc odłowu, zlokalizowanych w ośmiu krajach europejskich.

Ryby pozyskane do badań konserwowano alkoholem etylowym (75%), mrożono lub, jeśli było to możliwe, dostarczano do laboratorium żywe. W niektórych przypadkach materiał biologiczny stanowiła cała ryba, w większości były to jednak skrawki mięśni lub płetw. Z Estonii materiałem wyjściowym do badań było wyizolowane DNA w ilości 50 μ l. Ze względu na utrudniony dostęp (populacje z odległych rejonów) materiał często pochodził ze zbiorów instytutów badawczych, uczelni lub ośrodków PZW. Z tego powodu nie podano daty odłowu/pozyskania materiału poszczególnych prób.



Rys. 3a. Lokalizacja rodzimych badanych populacji certy; 1 – Wisła, 2 – Rega, 3 – Barycz, 4 – Parsęta, 5 – Noteć, 6 – Zalew Szczeciński, 7 – Jezioro Ostrowieckie



Rys. 3b. Miejsca pochodzenia prób poza Polską: A – Austria (Traunsee), B – Niemcy (Dunaj, Eder), C – Litwa (Morze Bałtyckie, Zalew Kuroński), D – Słowenia (Kolpa), E – Turcja (Büyük Menderes), F – Estonia (Pirita)

3.2. **Metodyka badań**

Wszystkie analizy laboratoryjne zostały wykonane przez autorkę w Instytucie Ekologii Wód i Rybactwa Śródlądowego (Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei) w Berlinie. Ze zgromadzonych osobników certy wyizolowano DNA i zamplifikowano fragment genu cyt. b. Wszystkie próby poddano analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem trzynastu enzymów. Po przeprowadzeniu elektroforezy żelowej, procedury oczyszczenia i powielenia uzyskanego produktu PCR dwóch fragmentów genu, próbki poddano sekwencjonowaniu. Łącznie reakcję izolacji wykonano 168 razy, ponieważ niektóre próby musiały mieć powtórzoną procedurę ze względu na zbyt małą ilość pozyskanego DNA. Analizę restrykcyjną przeprowadzono trzynastoma enzymami na próbach ze 137 osobników (łącznie 1880 razy). W niektórych przypadkach trawienie powtórzono, aby potwierdzić nowo pozyskane wzory restrykcyjne. Sekwencjonowaniu poddano łącznie 122 pojedyncze sekwencje (61 1FR i 61 2FR), które reprezentowały osobniki certy zróżnicowane pod względem pozyskanych wzorów restrykcyjnych. Do oceny pozyskanych haplotypów ostatecznie wykorzystano analizę porównawczą 28 kompletnych sekwencji nukleotydowych.

Tabela 4. Charakterystyka prób certy

Kraj	Populacja	Numery prób	Liczba osobników	Forma pozyskanego materiału	Źródło
Polska	Wisła	1–10	10	sprowadzone jako żywe	Jacek Wolnicki, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie
Polska	Wisła	116–125	10	całe ryby w 75-procentowym alkoholu	Aleksander Syguła, Ośrodek Hodowli Ryb w Ostrołęce
Polska	Rega	11–34	24	sprowadzone jako żywe	Jarosław Szysz, Ośrodek Zarybieniowy w Goleniowie
Polska	Barycz	35–38	4	całe ryby w 75-procentowym alkoholu	Rybacka Stacja Doświadczalna w Nowym Czarnowie
Polska	Paręta	39–44	6	skrawki płetw w 75-procentowym alkoholu	Sławomir Połomski, PZW w Koszalinie
Polska	Noteć	46–48	3	skrawki płetw w 75-procentowym alkoholu	Marek Raczkowski, Ośrodek Hodowli Pstrąga w Kuźniczce
Polska	Zalew Szczeciński	49–55	7	całe ryby zamrożone	Andrzej Kowalik, Baza Rybacka – „CERTA” w Trzebieży
Polska	Jezioro Ostrowieckie	56–65	10	całe ryby w 75-procentowym alkoholu	Piotr Hliwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Czechy	rzeka Jihlava	66–75	10	całe ryby w 75-procentowym alkoholu	Jitka Hamačková, Uniwersytet w Czeskich Budziejowicach, Vodniany, Czechy
Austria	Jezioro Traunsee	76–87	12	skrawki mięśni w 75-procentowym alkoholu	Barbara Lahnsteiner, Austriacka Akademia Nauk w Mondsee
Niemcy (Passau)	rzeka Donau	88–94	7	skrawki mięśni w 99-procentowym alkoholu	Martin Brändle, Uniwersytet w Marburgu, Niemcy
Niemcy	rzeka Eder (zlewnia rzeki Wesery)	95–102	8	skrawki mięśni w 99-procentowym alkoholu	Martin Brändle, Uniwersytet w Marburgu, Niemcy
Litwa	Smietina, Karklinirkas, Morze Bałtyckie/Zalew Kuroński	103–112	10	skrawki mięśni w 75-procentowym alkoholu	Jurij Maksimov, Instytut Rybactwa w Kłajpedzie, Litwa
Słowenia	rzeka Kolpa (zlewnia Sawy)	113–114	2	skrawki płetw w 75-procentowym alkoholu	Jorn Freyhof, Instytut Ekologii Wód i Rybactwa Śródlądowego w Berlinie, Niemcy
Turcja (Izmir)	rzeka Büyük Menderes	115	1	skrawki płetw w 75-procentowym alkoholu	Jorn Freyhof, Instytut Ekologii Wód i Rybactwa Śródlądowego w Berlinie, Niemcy
Estonia	rzeka Pirit (rzeka przymorska Morza Bałtyckiego)	126–138	13	wyzolowane DNA (50 µl)	Riho Gross, Uniwersytet Nauk Przyrodniczych w Tartu, Estonia

3.2.1. Izolacja DNA i elektroforeza testowa

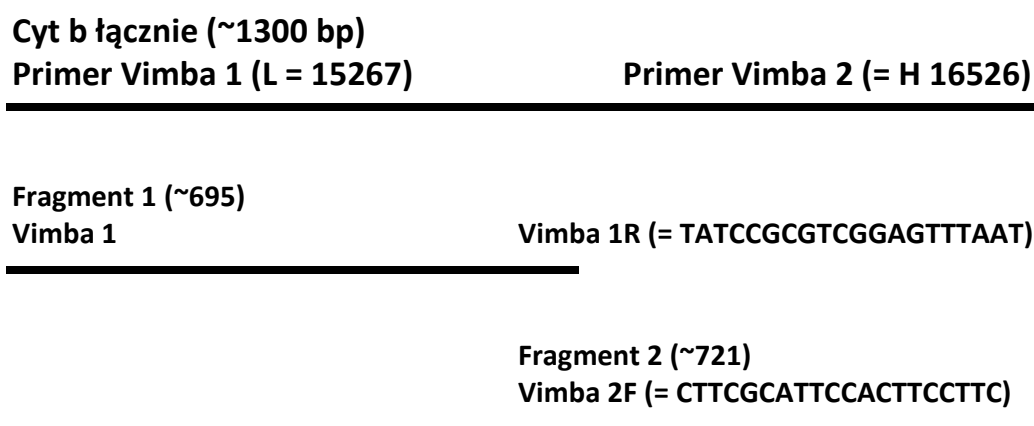
Do badań wykorzystywano pobierany w sterylnych warunkach skrawek płetwy lub mięśni o masie ok. 30 mg, który rozdrabniano i umieszczano w probówkach o objętości 1,5 ml. Izolację DNA przeprowadzano za pomocą zestawu do izolacji DNA z eukariotycznych komórek i tkanek (E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit, PeqLab Biotechnology, Niemcy). Rozdrobnioną tkankę zalewano buforem TL (200 µl) i proteazą K (25 µl). Całość inkubowano w temperaturze 55°C przez minimum 3 h w termomikserze Eppendorf COMPACT. W zależności od tempa lizy w niektórych przypadkach czas inkubacji wydłużano nawet do 11 h (bardzo odporne na działania proteazy okazały się twarde promienie płetw). Po przeprowadzeniu lizy tkanek do każdej próbki dodawano 220 µl buforu BL, po czym materiał mieszano i przez 10 min inkubowano w temperaturze 70°C. Do każdej próbki dodawano 220 µl etanolu absolutnego, a całą zawartość próbki mieszano (Vortexer Genie-2, Roth). Kolejnym etapem izolacji DNA było przelewanie zawartości na kolumny wiążące DNA, a próbkę wraz z kolumną wirowano z prędkością 8000 obr./min przez minutę (Eppendorf 5415R). Po związaniu DNA na kolumnie usuwano płyn pozostały po odwirowaniu. Następnie kolumny przekładano do nowych probówek i rozpoczynano proces wymywania DNA ze złoża. W tym celu na każdą kolumnę наносzono 750 µl buforu wypłukującego, po czym całość wirowano z prędkością 8000 obr./min przez minutę. Przesączony przez kolumnę supernatant usuwano. Czynność płukania powtarzano, a następnie rozpoczynano etap suszenia. W tym celu kolumny osadzano w nowych probówkach o pojemności 1,5 ml i wirowano z prędkością 14 000 obr./min przez 2 min. Po wyjęciu probówek rozpoczynano proces elucji, czyli wymywania DNA ze złoża. Polegał on na przepłukiwaniu buforem elucyjnym (EL) osuszonej kolumny ze związanym DNA, a następnie wirowaniu z prędkością 8000 obr./min przez 3 min. Był to ostatni etap, w którym nastąpiło uwolnienie skoncentrowanego DNA. Pozyskany w ten sposób materiał opisywano kolejnym numerem próby i przechowywano w temperaturze -80 °C do czasu dalszych analiz.

Celem sprawdzenia skuteczności izolacji każdą próbę poddawano testowej elektroforezie przez nałożenie 5 µl skoncentrowanego DNA wraz z barwnikiem obciążającym (6xLoading Dye, Fermentas, Niemcy) na żel agarozowy (1,7%). Obecność DNA potwierdzano przez jego wizualizację w świetle UV w procesie interkalacji z bromkiem etydyny (BIO-1D Analysis Software).

3.2.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Reakcję PCR fragmentu nukleotydowego przeprowadzano na podstawie komplementarnych starterów (rys. 4). Do badań wykorzystano parę starterów dla kompletnej sekwencji genu cyt. b (L15267 i H16526) opublikowanych przez Briolay i innych [1998]. Wprowadzono dodatkową parę primerów wewnętrznych oznaczonych symbolami Vimba1R i Vimba2F, które pozwoliły na amplifikację genu cyt. b w dwóch niezależnych fragmentach.

Na podstawie dwóch amplifikowanych fragmentów o długości 695 pz i 721 pz pozyskano wspólny odcinek, tzw. *overlapping*, o długości 116 pz, który wskazał miejsce łączenia się obu fragmentów.



Rys. 4. Schemat działania dwóch par primerów dla certy (sekwencją wyjściową jest gen cyt. b)

W tabeli 5 przedstawiono charakterystykę starterów skonstruowanych dla Cyprinidae, na podstawie kompletnej (1300 pz) sekwencji genu cyt. b zawierającego tRNA-Thr i część tRNA-Glu i tRNA-Pro [Chang i inni, 1994].

Tabela 5. Molekularna charakterystyka starterów syntetyzowanych przez firmę Biomers.net

Symbol starteru	Sekwencja (5'→3')	Referencja	Wielkość produktu
Vimba1	AAT GAC TTA AAG AAC CAC CGT	Chang i inni, 1994	695pz
Vimba1R	TAT CCG CGT CGG AGT TTA AT	Kempter (niepublikowane)	
Vimba2F	CTT CGC ATT CCA CTT CCT TC	Kempter (niepublikowane)	721pz
Vimba2	CTT TGG GAG YYR RGG GTG RGA	Chang i inni, 1994	

Reakcję PCR prowadzono na próbce o objętości 50 µl. Aby zminimalizować efekt parowania podczas podgrzewania próby, w termocyklerze zastosowano olej mineralny. Parowanie próbki obniża efektywność procesu amplifikacji i jest przyczyną powstawania niespecyficznych produktów, jakimi najczęściej są spolimeryzowane startery.

Do sporządzania mieszaniny reakcyjnej (Master Mix) stosowano wolną od DNA-z i RNA-z wodę przeznaczoną do biologii molekularnej (ultra PURE, Life Technologies) oraz olej mineralny (M5904, SIGMA). Podstawą mieszaniny była termostabilna polimeraza Taq (Fermentas, Niemcy) izolowana z bakterii *Thermus aquaticus*. Skład ilościowy mieszaniny zestawiono w tabeli 6.

Polimerazę Taq przygotowano, rozcieńczając ją w wodzie DEPC w stosunku odpowiednio 0,2 µl i 19,8 µl. Zastosowana do reakcji PCR mieszanina składała się z 20 µl Master Mix, 20 µl roztworu polimerazy i 10 µl skoncentrowanego DNA.

Tabela 6. Skład mieszaniny reakcyjnej (Master Mix)

Składnik	Ilość [μ l]
Woda	5,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
dNTP	2,5
MgCl ₂	5,0
Starter F	1,0
Starter R	1,0
Polimeraza	20
Matryca DNA	10
Olej	15

Poszczególne etapy reakcji PCR przebiegały zgodnie z następującym profilem termicznym:

- wstępna denaturacja – 95°C przez 3 min,
- denaturacja – 95°C przez 30 s,
- przyłączanie starterów – 55°C przez 30 s,
- reakcja polimeryzacji – 72°C przez 60 s,
- końcowe wydłużanie – 72°C przez 3 min,
- schłodzenie próbek do 4°C.

Etapy 2–4 powtarzano 34 razy (pętla PCR), co pozwoliło na uzyskanie satysfakcjonującej ilości DNA. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze Mastercycler Gradient (Eppendorf).

3.2.3. Elektroforeza żelowa

Do rozdziału elektroforetycznego produktu PCR wykorzystano aparat PowerPack™ Basic (BioRad) i 1,7-procentowy żel agarozowy (Agarosa plus, PRONA), zanurzony w 80 ml buforu TBE (Fermentas, Niemcy) z dodatkiem 3 μ l bromku etydyny (Roth). Zastosowano marker wielkości GeneRuler 100 pb Ladder Plus (Fermentas, Niemcy). Elektroforeza zachodziła w jednokrotnie stężonym buforze TBE przez 60 min przy napięciu 120 V i natężeniu 45 mA. Do analizowania żeli używano aparatu generującego promienie UV. Szacowanie wielkości pozyskanych produktów PCR prowadzono za pomocą programu BIO-1D Analysis Software Elektrophoresis Images (Vilber Lourmat), pozwalającego na obróbkę i katalogowanie zdjęć.

3.2.4. Analiza restrykcyjna (PCR-RFLP)

Pozyskany produkt PCR poddano trawieniu z wykorzystaniem trzynastu enzymów restrykcyjnych (Fermentas, Niemcy). Dla każdego produktu wstępnie przeprowadzono wirtualne trawienie. Użyto do tego referencyjnej sekwencji całego genu cyt. b pozyskanej z GenBanku (AY026404) i programu Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). Literą A oznaczono wzór restryktrogramu pozyskany na podstawie trawienia sekwencji referencyjnej. Kolejnymi literami (B, C itd.) opisywano wzory restrykcyjne różniące się liczbą lub wielkością prążków. W ten sposób badane osobniki zostały zaklasyfikowane do odpowied-

niego haplotypu. Wszystkie haplotypy scharakteryzowano na podstawie kompilacji wyników uzyskanych z trawienia 13 enzymami. Charakterystykę wykorzystanych enzymów przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Charakterystyka restryktaz zastosowanych do analizy genu cyt. b (za pomocą programu Webcutter 2.0; (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>))

Enzym	Temperatura inkubacji (°C)	Sekwencja (5'→3')	Numer katalogowy	Oczekiwane miejsca cięcia (Webcutter 2.0)
Eco 47I (AvaII)	37	G↓GACC	836	101, 870
BsuRI (HaeIII)	37	GG↓CC	151	154, 302, 1052
HinFI	37	G↓ANTC	801	230, 488, 1010
RsaI	37	GT↓AC	1121	brak miejsca cięcia
AluI	37	AG↓CT	11	brak miejsca cięcia
MboI	37	↓GATC	811	313, 844
HpaII	37	C↓CGG	511	569, 626
Hin6I (HinP1)	37	G↓CGC	481	47, 295, 572
TaqI	65	T↓CGA	673	56, 237
XbaI	37	T ↓CTAGA	681	brak miejsca cięcia
SsiI	37	C↓CGC	1791	185, 500, 646
SspI	37	AAT↓ATT	1522	78, 342
FokI	55	GGATGNN↓	12214	1065, 1112

W celu efektywnego strawienia fragmentu genu cyt. b ustalono następujący skład mieszaniny reakcyjnej: 1,5 µl buforu (odpowiedniego dla każdego enzymu), 3,2 µl H₂O (DEPC) oraz 0,3 µl enzymu. Do 5 µl mieszaniny dodawano 10 µl produktu PCR, co pozwalało na uzyskanie łącznej objętości próbki – 15 µl, którą poddawano trawieniu w termobloku (Eppendorf). Po trawieniu pozyskane fragmenty DNA poddawano elektroforezie na żelu agarozowym według metodyki analogicznej do elektroforezy po reakcji PCR (rozdz. 3.2.3.).

Pozyskane wzory restrykcyjne poddawano analizie przez odczytywanie wielkości fragmentów i porównywanie do wzorca określonego jako haplotyp A.

3.2.5. Sekwencjonowanie fragmentu genu cytochromu b

Wyizolowany w wyniku reakcji PCR fragment genu cyt. b o wielkości 1300 pz poddano sekwencjonowaniu, rozdzielając go uprzednio na dwa fragmenty. Pierwszy był ograniczony starterami Vimba1 i Vimba 1R, a drugi – starterami Vimba 2F i Vimba 2. Kolejnym etapem było oczyszczanie pozyskanych fragmentów z zastosowaniem zestawu E.Z.N.A. ® CYCLE-PURE, Classic-Line (PeqLab, Biotechnologie). Umożliwia on skuteczne oczyszczenie amplikonów o wielkości od 50 pz do 4000 pz. Zastosowane w reakcji kolumny (HiBind® – DNA) mogą jednorazowo związać do 30 µg DNA. Każdą próbę poddano ocenie ilościowej biofotometrem (Eppendorf). Na tej podstawie i posiłkując się zestawieniem do kwantyfikacji

wania DNA (Beckman Coulter), ustalano ilościowy skład mieszaniny do sekwencjonowania. Oczyszczone próby poddawano kolejnej reakcji PCR (oddzielnie dla każdego fragmentu genu opisanego na rys. 4). Namnożony fragment strącano etanolem absolutnym o temperaturze -20°C w procesie trwającym 10 min. Suszenie polegało na wirowaniu zawartości próbki przez 15 min (10 000 obr./min). Uzyskany pelet ponownie przepłukiwano 80-procentowym etanolem (700 μl) i wirowano przez 2 min (10 000 obr./min). Czyste, skoncentrowane DNA przygotowane do sekwencjonowania osuszano w temperaturze pokojowej przez 2 min, po czym rozcieńczano w 20 μl dejonizowanej, sterylnej wody (DEPC), zachowując $\text{pH} = 9$.

Sekwencjonowanie przeprowadzono z zastosowaniem odczynników CEQ DTCS – *Quick Start Kit*, postępując zgodnie z zaleceniami producenta. Oba sekwencjonowane fragmenty porównano za pomocą programu CEQ 8000 Genetic Analysis System, który umożliwia uliniowanie sekwencji wzorcowej z badanymi próbkami. W efekcie polimorfizm w obrębie genu cyt. b ustalano na podstawie wyliczonego dystansu genetycznego (dywergencji) między poszczególnymi haplotypami. Dane te następnie wykorzystano do ustalenia wzajemnych korelacji filogenetycznych pomiędzy poszczególnymi populacjami.

3.2.6. Analiza sekwencji

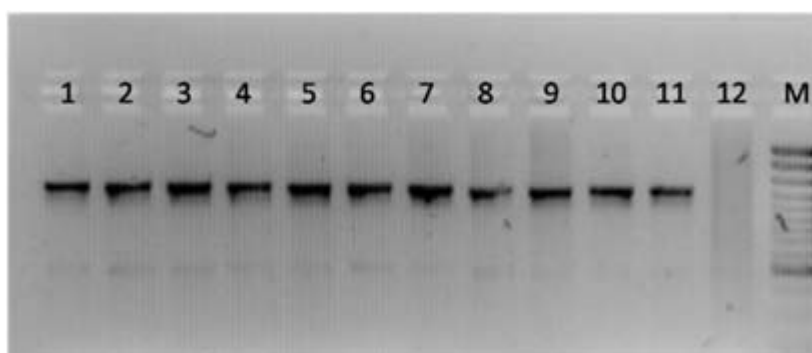
Półkowe surowe sekwencje reprezentujące każdy z pięciu haplotypów (od H1 do H5) otrzymane w wyniku sekwencjonowania zostały połączone, przekonwertowane do formatu FASTA i uszeregowane w notatniku. Tak przygotowane sekwencje zaimportowano do programu Clustal X, po czym porównywano je parami, a następnie przez budowanie alignmentu, łącząc najbliższe sobie pary [Larkin i inni, 2007]. Po zapisaniu otrzymanych wyników (plik.aln) dane zaimportowano do programu BioEdit. Program ten umożliwia graficznie zestawienie punktowych różnic pomiędzy sekwencjami oraz pozwala wyliczyć udział poszczególnych nukleotydów w analizowanych sekwencjach reprezentujących oszacowane haplotypy [Hall, 1999]. Graficzne dedukowanie struktury drzewa filogenetycznego na podstawie sekwencji wykonano w programie MEGA 4, wykorzystując do tego celu wcześniej otrzymany plik z uliniowanymi sekwencjami [Tamura i inni, 2007]. Ponadto uzyskano liczbowy i procentowy skład nukleotydów w sekwencjach poszczególnych haplotypów oraz opierając się na modelu Jukesa i Cantora [1969], scharakteryzowano liczbowe odległości między sekwencjami. Na ich podstawie skonstruowano drzewo filogenetyczne. Ponadto, aby sprawdzić względną częstotliwość rzadkich alleli w miejscach równoznacznych i nierównoznacznych, porównano średnią liczbę zmiennych nukleotydów oraz liczbę miejsc segregacyjnych osobno dla polimorficznych miejsc jednoznacznych i wieloznacznych. Zastosowany test neutralności Tajimy [1989] umożliwił porównanie liczby miejsc segregujących w analizowanej sekwencji, przypadających na jedno miejsce segregacji. Tajima za miejsce segregacji uważa taki fragment genu, w którym podczas porównania m sekwencji (oznaczenie zob. w tabeli 12) zlokalizowanych jest więcej niż dwa nukleotydy. Różnorodność nukleotydową Tajima opisuje zatem jako uśrednioną wartość różnic nukleotydowych przypadających w analizowanym fragmencie DNA na jedno miejsce segregacji. Zakładając, że wszystkie allele są selektywnie (wybiórczo) neutralne (tzw. próba zerowa), produkt $4NV$ (N – efektywna wielkość populacji, V – liczba mutacji przypadająca na analizowane miejsce segregacji) można zdefiniować pod kątem sta-

bilności lub różnicowania ewolucyjnego. Pojawienie się różnicy (ujemnej wartości) w teście sugeruje, że analizowana próba (grupa osobników) jest na etapie selekcji (różnicowania), a populację należy uznać za niestabilną genetycznie.

4. Wyniki

4.1. Izolacja DNA

W wyniku izolacji wszystkich osobników certy uzyskano ilość DNA wystarczającą do przeprowadzenia reakcji PCR. Ilość i jakość wyizolowanego DNA w próbach oceniano na podstawie braku niespecyficycznych prążków. Obecność wyraźnego sygnału na żelu była podstawą do wykorzystania pozyskanego DNA do przeprowadzenia reakcji PCR. W wyniku amplifikacji fragmentu mtDNA ograniczonego primerami Vimba1 i Vimba2 otrzymano produkt o długości 1300 pz (rys. 5).

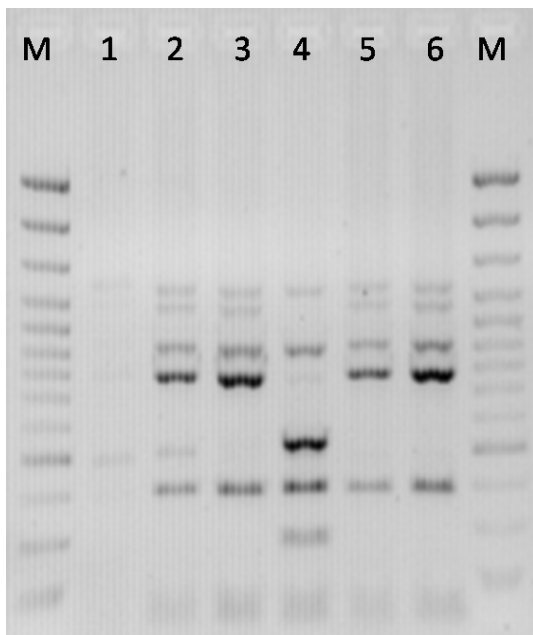


Rys. 5. Przykładowe produkty po reakcji PCR (wielkość 1300 pz) uzyskane dla certy. Kolejne ścieżki przedstawiają wybrane próby (osobniki) pozyskane z następujących populacji: 1, 2, 3 – Wisła (tab. 4, poz. 1), 4–7 – Rega, 8, 9 – Barycz, 10, 11 – Czechy, 12 – Austria, 13 – marker wielkości (100 bp, Fermentas)

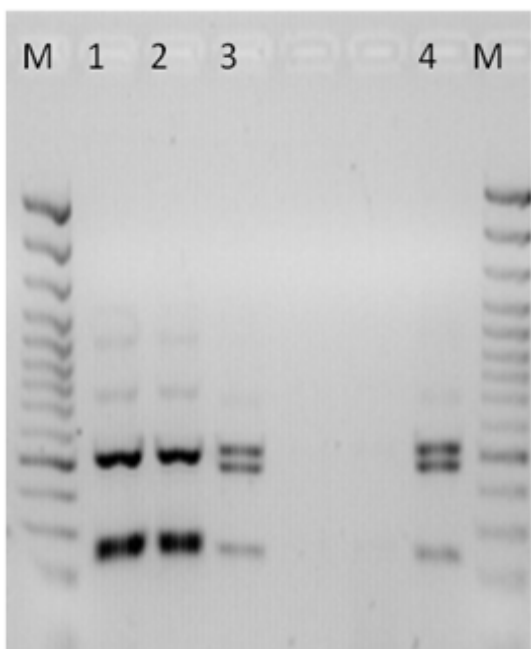
4.2. Trawienie enzymami restrykcyjnymi i charakterystyka pozyskanych haplotypów

Dla uzyskania informacji na temat homologii/zmienności sekwencji badanego genu w populacjach certy pochodzących z odległych rejonów geograficznych ustalono wzór restrykcyjny (oznaczony symbolem A), przyjęty w niniejszych badaniach jako wzorzec dla gatunku *Vimba vimba*, wskazujący na miejsca cięcia dla poszczególnych enzymów na podstawie sekwencji referencyjnej (GenBank numer AY026404). Zgodnie z wyznaczonymi miejscami restrykcji (tab. 7) i po porównaniu ich z wzorami dla poszczególnych osobników ustalono restryktrogramy dla poszczególnych enzymów. W przypadku EcoRI, HinfI, Hin6I i Ssi uzyskano również drugi, inny niż oczekiwany wzór restrykcji, który wskazuje na obecność substytucji we fragmencie genu cyt. b w porównaniu z sekwencją referencyjną. Zmieniona sekwencja, a tym samym przesunięcie miejsc restrykcji, pozwoliła na wyselekcjonowanie z analizowanych osobników certy te ryby, które potencjalnie charakteryzowały się zmiennością w obrębie mtDNA. Pozyskane wzory A i B przedstawiono poniżej wraz z opisem pochodzenia osobników (ścieżka 4 dla EcoRI, 3 i 4 dla enzymu HinfI, 1 i 4 dla Hin6I oraz 5 dla

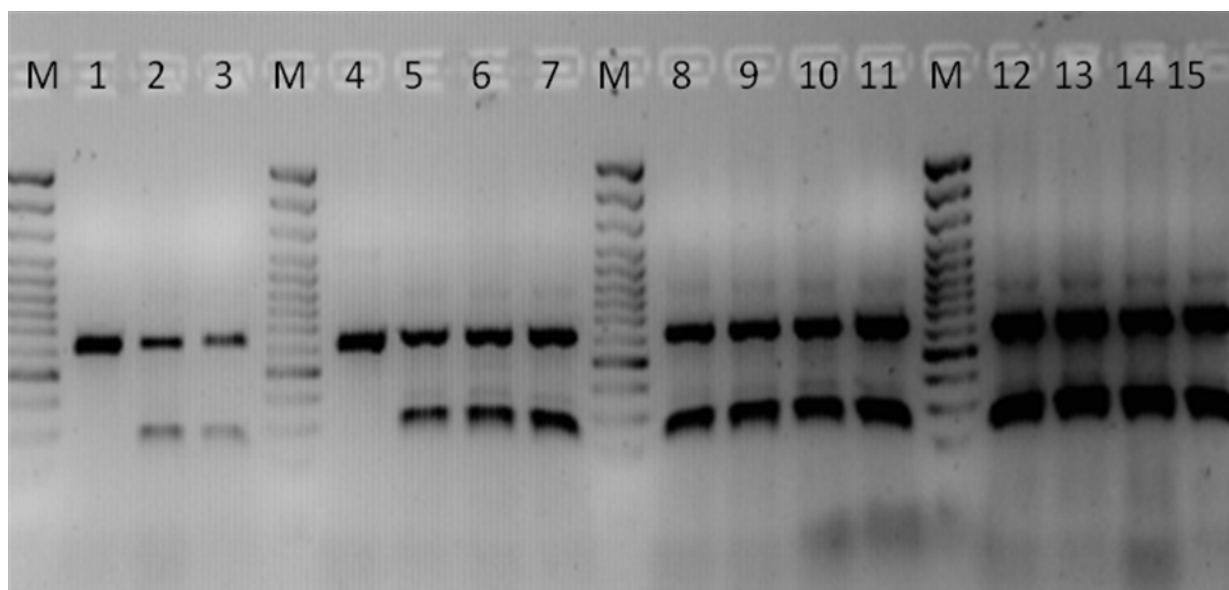
enzymu Ssi). Na rysunkach 6–9 przedstawiono dwa różne wzory restrykcyjne, których obecność sugerowała istnienie różnic w układzie nukleotydów w analizowanym fragmencie genu. Takie osobniki/próby poddano sekwencjonowaniu.



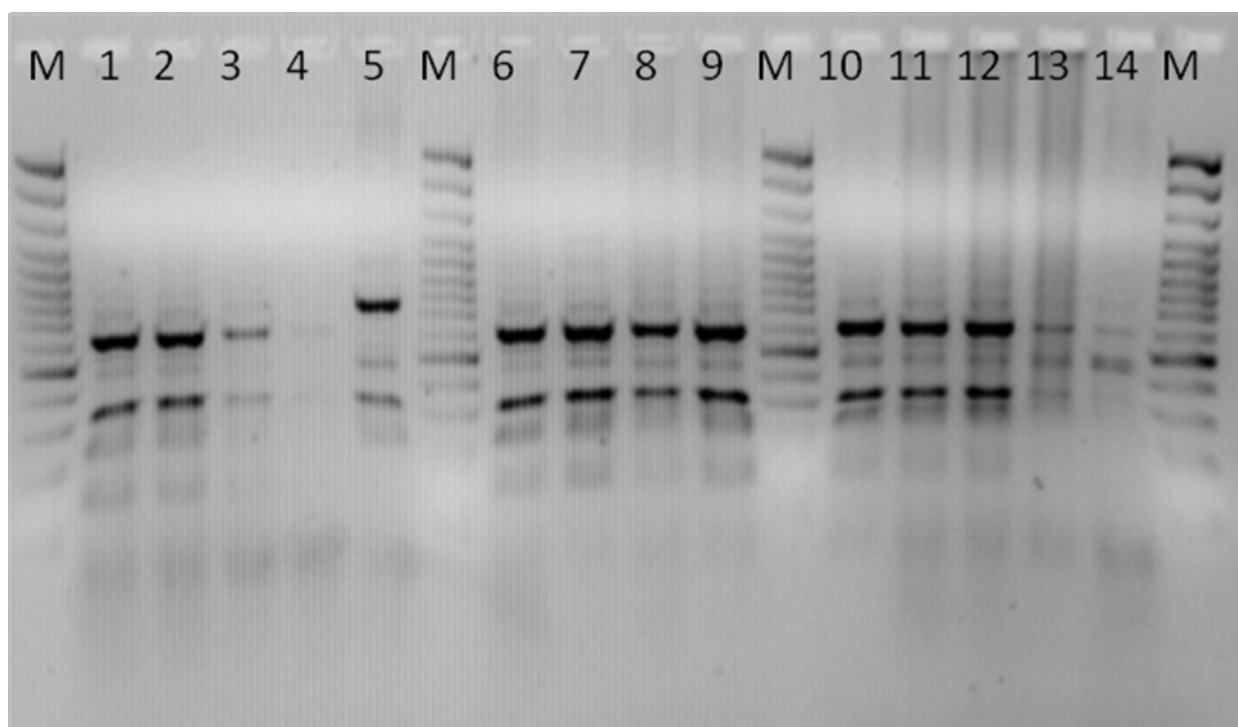
Rys. 6. Restrykcyjny obraz DNA, będący wynikiem trawienia enzymem Eco47I. Kolejne ścieżki przedstawiają wybrane próby (osobniki certy) pozyskane z następujących populacji: 1 – Noteć (48), 2 – Turcja (115), 3 – Słowenia (114), 4 – Słowenia (113), 5 – Austria (81), 6 – Austria (80), M – marker wielkości (100 bp, Fermentas)



Rys. 7. Restrykcyjny obraz DNA pozyskany w wyniku trawienia enzymem HinfI następujących prób certy: 1 – Niemcy, Eder (100), 2 – Niemcy, Dunaj (88), 3 – Litwa (110), 4 – Litwa (104), M – marker wielkości (100 bp, Fermentas)



Rys. 8. Restrykcyjny obraz DNA uzyskany w wyniku trawienia enzymem *Hin*6I następujących próbek certy: 1–4 – Litwa (110, 108, 105, 104), 5–11 – Niemcy, Eder (102, 101, 100, 99, 98, 97, 96), 12–15 – Niemcy, Dunaj (95, 94, 93, 92), M – marker wielkości (100 bp, Fermentas)



Rys. 9. Restrykcyjny obraz DNA uzyskany w wyniku trawienia enzymem *Ssi*I następujących próbek certy: 1–3 – Niemcy, Dunaj (91, 90, 89), 4 – Litwa (112), 5 – Turcja (115), 6–7 – Słowenia (114, 113), 8–13 – Austria (81, 80, 79, 78, 84, 77), 14 – Noteć (48), M – marker wielkości (100 bp, Fermentas)

Na podstawie analizy restrykcyjnych obrazów DNA ustalono, że w analizowanych próbkach DNA certy występuje pięć haplotypów (wzorców allelicznych), które zestawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Określenie haplotypów na podstawie pozyskanych restryktogramów

Haplotyp	Populacja	Nr próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
			Eco 47I	BsuRI	HinfII	RsaI	AluI	MboI	HpaII	Hin6I	TaqI	XbaI	SsII	SspI	FokI
1	Wisła	9	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	Dunaj	93	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	Traunsee	84	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	A	A	A
4	Noteć	48	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5	Estonia	137	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	A

Udziały poszczególnych haplotypów w badanych populacjach certy przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Procentowy udział poszczególnych haplotypów w analizowanych populacjach certy

Populacja	H1	H2	H3	H4	H5
Wisła	100				
Rega	100				
Barycz	100				
Parsęta	100				
Noteć				100	
Zalew Szczeciński	100				
Jezioro Ostrowieckie	100				
Czechy	100				
Austria (Traunsee)			100		
Niemcy (Dunaj)	42,8	57,2			
Niemcy (Eder)	100				
Litwa (Morze Bałtyckie)	100				
Słowenia (Kolpa)	50	50			
Estonia	92,3				7,7
Turcja*					

*Na podstawie analizy restrykcyjnej, bez możliwości poddania sekwencjonowaniu próby z rzeki Büyük (Turcja), przypuszcza się, że reprezentowany jest tutaj haplotyp (H6?) niewystępujący wśród badanych cert. Ze względu na zbyt małą ilość DNA i brak możliwości potwierdzenia wyniku analizy restrykcyjnej analizą składu nukleotydowego haplotypu tego nie ujęto w zestawieniu wyników.

Populacje z terenu Polski, z wyjątkiem certy noteckiej, są homogenne genetycznie i reprezentują haplotyp 1 (H1). Nie stwierdzono żadnych różnic między populacjami pochodzącymi nawet z odległych obszarów geograficznych Polski (certy zalewowa i wiślana). Wyniki badań wskazują na odrębność genetyczną certy z Noteci. Wszystkie osobniki reprezentowały haplotyp 4 (H4), który charakteryzuje się występowaniem substytucji w sekwencji rozpoznawalnej przez enzym *Hinf*I (G↓ANTC). Przekładając wynik analizy restrykcyjnej na sekwencję nukleotydową genu *cyt. b*, charakteryzującą haplotyp 4, można wskazać wiele substytucji i delecji zestawionych w tabeli 10. Wszystkie osobniki z terenu Polski reprezentowały tylko 2 spośród pięciu zdefiniowanych haplotypów (H1 i H4).

W populacjach europejskich zaobserwowano większą różnorodność genetyczną, zarówno wewnątrzpopulacyjną (certy z rzek Dunaj i Kolpa oraz z Estonii), jak i międzypopulacyjną. Populacje z Czech, Austrii, Niemiec, Litwy, Słowenii i Estonii reprezentowały 4 spośród pięciu haplotypów (tab. 9). Zróżnicowanie w obrębie populacji certy z Dunaju wskazuje na obecność dwóch haplotypów (H1 i H2), co odpowiada zróżnicowaniu populacji z rzeki Kolpy w Słowenii. Jedynie populacja z Estonii była odmienna. Haplotyp 1 (H1) reprezentowało 92,3% osobników certy i był on najczęściej spotykany wśród analizowanych ryb, przy czym w tej populacji stwierdzono zupełnie nowy, nigdzie wcześniej niespotykany haplotyp 5 (H5), reprezentowany przez niewielką część populacji (7,7%).

4.3. Uliniowanie pozyskanych sekwencji i analiza poziomu ich zmienności

W pierwszym analizowanym fragmencie genu odpowiedzialnego za syntezę cyt. b u certy (ograniczonego primerami Vimba1–Vimba1R) stwierdzono występowanie mutacji w pozycjach 37, 42–44, 397 i 472. W drugim analizowanym fragmencie, którego amplifikacja została ograniczona primerami Vimba2F–Vimba2, zlokalizowano 12 substytucji w następujących pozycjach: 110, 334, 560, 607, 624, 625, 657, 658, 670, 671 i 688. Biorąc pod uwagę długość obu fragmentów genu, wynoszącą odpowiednio 695 i 721 pz, należy zwrócić uwagę na rejony o zdecydowanie większej zmienności, czyli odcinki, w których zaobserwowano znacznie wyższą podatność na pojawianie się substytucji. Są to fragmenty genu cyt. b ograniczone pozycjami 37–472 (fragment 1) oraz 110–688 (fragment 2), (rys. 10).

W tabeli 10 zestawiono pozycje, w których występują podstawienia nukleotydów w analizowanym genie cyt. b. W pierwszym fragmencie genu, o wielkości 695 pz, stwierdzono wymianę adeniny na guaninę (A→G) w porównaniu z sekwencją referencyjną (we wszystkich pozyskanych haplotypach), występującą w pozycji 37, oraz wielokrotne delecje we fragmencie 42–44 i pozycjach 397, 472. Zdecydowanie większą zmienność potwierdzono w drugim fragmencie genu (długość 721 pz), w którym oprócz delecji w pozycjach 42–44, 397 i 472 zidentyfikowano też substytucje typu A→T, G→C w 12 pozycjach.

Analiza wysycenia genu cyt. b poszczególnymi zasadami (A, T, G, C) pozwoliła na określenie stopnia zmienności nukleotydowej w opisywanych haplotypach. Zaobserwowano, że najwyższe wysycenie adeniną występowało w haplotypach 1 i 5 (28,2%). W przypadku guaniny zróżnicowanie w porównaniu z sekwencją referencyjną było niewielkie, gdyż w haplotypach 1, 2 i 4 wynosiło 15,6%. Cytosyna i tymina miały w sekwencji referencyjnej najwyższy udział – odpowiednio 27,2 i 29,9%, i w żadnym z opisanych haplotypów nie stwierdzono wyższej zawartości tych zasad w składzie nukleotydowym genu cyt. b. Graficzne zestawienie wysycenia poszczególnymi nukleotydami wraz z przyrównaniem do sekwencji referencyjnej oraz wyznaczeniem średniego udziału poszczególnych zasad przedstawiono na rysunku 11.

Tabela 10. Zestawienie najbardziej zmiennych rejonów w dwóch fragmentach genu cyt. b, ze wskazaniem numeru substytucji w stosunku do sekwencji referencyjnej

Próba	Haplotyp	Fragment 1			
	pozycja referencja	37	42–44	397	472
9	H1	G	del	•	•
93	H2	G	del	G	•
84	H3	G	del	•	C
48	H4	G	del	•	•
137 (12)	H5	G	del	•	•
7	H1	G	del	•	•
1	H1	G	del	•	•

Tabela 10 cd.

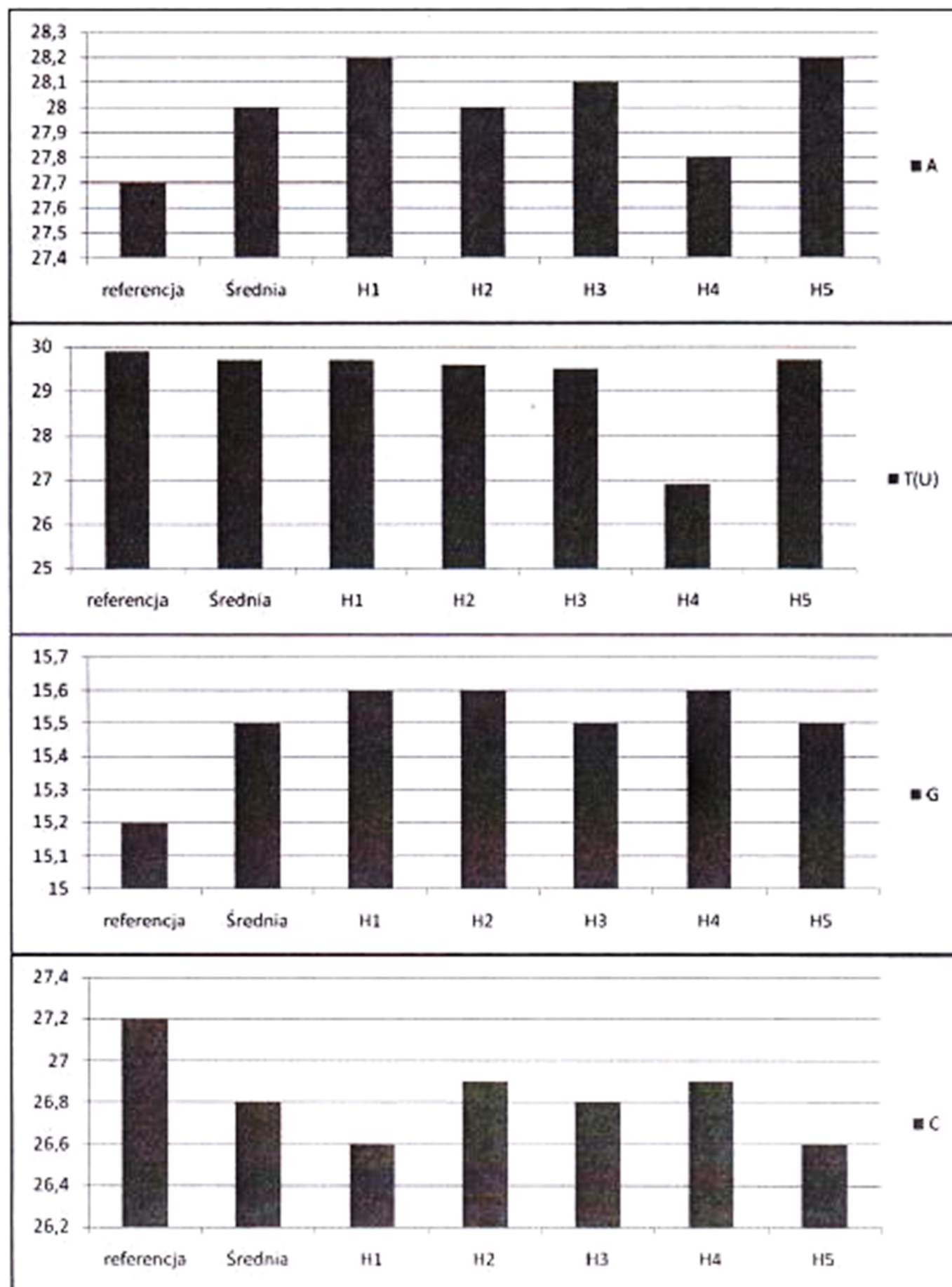
Próba	Haplotyp		Fragment 2											
	pozycja	referencja	110	334	560	607	624	625	627	657	658	670	671	688
			G	A	C	T	C	C	A	G	A	T	C	G
9	H1		•	•	•	C	T	T	T	A	G	C	T	–
93	H2		•	•	•	C	T	T	T	A	G	C	T	A
84	H3		•	•	•	C	T	T	T	A	G	C	T	A
48	H4		•	G	T	C	T	T	T	A	G	C	T	A
137 (12)	H5		A	•	•	C	T	T	T	A	G	C	T	A
7	H1		•	•	•	C	T	T	T	A	G	C	T	A
1	H1		•	•	•	C	T	T	T	A	G	C	T	–

Oszacowanie składu procentowego genu lub jego większego fragmentu pozwala na próbę określenia poziomego transferu danego genu wśród badanych grup osobników, a tym samym na ustalenie jego pochodzenia (zewnętrzne lub wewnętrzne). Analizując graficzny obraz wysycenia sekwencji genu cyt. b poszczególnymi nukleotydami, można stwierdzić, że dla uzyskanych haplotypów praktycznie tylko tymina utrzymywała się na średnim poziomie. Zarówno adenina (H1 i H5) jak i guanina (H1, H2 i H4) wykazywały tendencję wzrostową, gdy za punkt odniesienia przyjęto sekwencję referencyjną dla analizowanego genu certy.

Na podstawie analizy sekwencji oraz ustalenia liczb podstawień i delecji oszacowano poziom zmienności poszczególnych haplotypów. Jak wynika z tabeli 11, najwyższa zmienność w porównaniu z sekwencją referencyjną występuje w haplocie H4 (0,018). Jest on reprezentowany przez osobniki pozyskane z Noteci. Wysoką zmiennością charakteryzują się osobniki reprezentujące haplotypy H2, H3 i H5 w porównaniu z haplotypem H4. Oznacza to, że certy pochodzące z Dunaju, Traunsee (Austria) oraz Estonii i Regi wykazują większą zmienność międzypopulacyjną w porównaniu z certami pochodzącymi z Noteci.

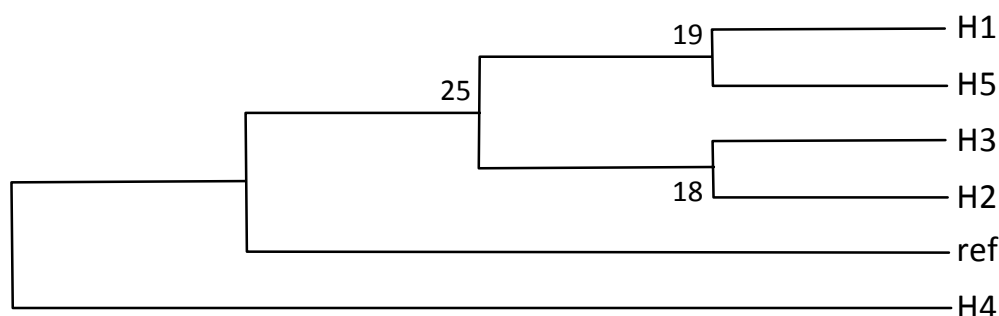
Tabela 11. Zmienność nukleotydomowa w obrębie pozyskanych haplotypów (średnia zmienność wynosi 0,0015)

Haplotyp	Zmienność					
	H1	H5	H3	H2	REF.	H4
H1	–					
H5	0,0009	–				
H3	0,0009	0,0018	–			
H2	0,0009	0,0018	0,0018	–		
REF	0,0000	0,0009	0,0009	0,0009	–	
H4	0,0018	0,0026	0,0026	0,0026	0,0018	–



Rys. 11. Wysycenie sekwencji haplotypów poszczególnymi zasadami: A – adenina, C – cytozyna, G – guanina, T – tymina, sekwencja referencyjna (AY026404)

Porównując cechy (obserwowaną cechą była tu sekwencja genu cyt. b), uzyskano drzewo filogenetyczne, ukazujące związki (zależności) między pozyskanymi haplotypami (rys. 12). Pojawienie się czterech węzłów wskazuje na dość dużą różnorodność w obrębie gatunku *Vimba vimba*. Pierwszy kład drzewa tworzą przedstawiciele populacji z Wisły (H1) i Estonii (H5), drugi zaś z Austrii (Traunsee) i Niemiec (Dunaj). Zupełnie niezależnym taksonem, umocowanym na odizolowanej nawet od sekwencji referencyjnej gałęzi, jest haplotyp H4, reprezentowany przez certy notecką. Długość gałęzi, będąca miarą dywergencji genów, wskazuje na to, że odległość filogenetyczna między certy notecką a wszystkimi pozostałymi haplotypami jest zdecydowanie większa niż w obrębie haplotypów H1, H2, H3 i H5. Wynik analizy filogenetycznej potwierdza zróżnicowanie między badanymi populacjami certy, które zestawiono liczbowo w tabeli 11.



Rys. 12. Drzewo ilustrujące zależności filogenetyczne dla analizowanych haplotypów certy. H1 – populacja Wisła, H2 – populacja Niemcy (Dunaj), H3 – populacja Austria (Traunsee), H4 – populacja Noteć, H5 – populacja Estonia (Pirita)

Na podstawie analizowanych sekwencji wykonano test neutralności Tajima (tab. 12). Porównano sześć sekwencji nukleotydowych (w tym jedną referencyjną), z których każda reprezentowała określony haplotyp. Po wykluczeniu z nich wszystkich przerw (*gaps*) i niekompletnych części (przednie i końcowe nukleotydy, nietworzące wyraźnych pików) test ten pozwala na określenie poziomu stabilności badanej grupy ryb. Ujemna wartość D świadczy o tym, że badana grupa ryb jest w trakcie selekcji/różnicowania, a analiza sekwencji reprezentujących poszczególne warianty genetyczne wskazuje na niestabilność badanych populacji (grup) w relacji do całej próby.

Tabela 12. Wyniki testu Tajima przeprowadzonego dla sześciu sekwencji (m – liczba sekwencji, S – liczba segregowanych sekwencji, $p_s = S/\pi$ – zmienność nukleotydowa, D – wartość Tajima)

m	S	p	π	D
6	5	0,004386	0,001462	-1,33698

5. Dyskusja

5.1. Zróżnicowanie rodzimych populacji certy w aspekcie ochrony gatunku i zachowania bioróżnorodności

5.1.1. Zlewnia Wisły

Gospodarka zarybieniowa certy wód w Polsce ma dość słabo udokumentowany przebieg. Wiadomo, że produkcję jesiennego materiału zarybieniowego rybca (wówczas tak określano certy) po raz pierwszy podjęto w ośrodku stawowym w Słupowie w latach 70. ubiegłego wieku [Wajdowicz, 1971]. Wykorzystując tarlaki z Czarnej Orawy, pozyskano wystarczającą (ok. 50 tys. sztuk) ilość materiału do zarybienia rzeki Łękawki. Wiadomo, że pierwszy wsiedlony w Polsce materiał certy pochodził z dorzecza Dunaju, a akcję zarybieniową przeprowadzono w zbiorniku zaporowym Tresna (spiętrzenie Soły) [Wajdowicz, 1968]. Wykorzystując wysoką plastyczność w obrębie gatunku certy i jej znaczne zdolności przystosowawcze, podjęto decyzję o rozpoczęciu programu wsiedlania certy do zlewni Wisły, uznając za celowe wykorzystanie materiału pochodzącego z rejonu Jeziora Pskowsko-Czudskiego w byłym ZSRR. Analizując dane dotyczące tej populacji, stwierdzono, że jest to odmiana podatniejsza na próby pozyskania dojrzałych tarlaków w systemie chowu sadzowego niż tzw. nasza certy [Wajdowicz, 1968]. Po przegrodzeniu Wisły zaporą we Włocławku (1969) drastycznie zmalały połowy tego gatunku, praktycznie ustając powyżej zapory w 1982 roku. Od roku 1986 w dolnej Wiśle już nie obserwowano tego gatunku [Bontemps, 1960; Bartel, 2002]. W raporcie określającym stopień zagrożenia słodkowodnej ichtiofauny Polski [Witkowski i inni, 2009] certy z dorzecza Wisły została scharakteryzowana jako „nieliczna populacja certy wędrownej”, która zachowała się w dolnym odcinku Wisły i Drwęcy, oraz jako „nieliczne lokalne populacje” obecne powyżej zapory włocławskiej.

Sytuacja taka wymusiła wdrożenie programów, których głównym celem było ratowanie ginących populacji. W latach 70. i wczesnej dekadzie lat 80. XX wieku sześciokrotnie przenoszono tarlaki powyżej zapory, licząc, że przystąpią do tarła i wzmocnią tamtejszą populację. Od tego momentu stosuje się określenie „stada lokalne” certy bytującej w części powyżej i poniżej zapory na Wiśle [Bartel, 1992]. Wszystkie akcje zarybieniowe finansował Polski Związek Wędkarski. Do Wisły udało się wprowadzić niewielkie ilości certy [Bartel, Kleszcz, 2008].

5.1.2. Zlewnia Odry

Sytuacja **certy odrzańskiej** była nieco inna. Program restytucji ryb wędrownych [Sych, 1996] zakładał zarybienia mające na celu wprowadzenie materiału szlakiem Odra – Warta – Noteć – Drawa. Zły stan wód środkowego biegu Odry był przeciwwskazaniem dla planowanych akcji zarybieniowych w tym regionie [Witkowski i inni, 2004]. Obecność w Odrze dwóch form certy o różnym zasięgu wędrówek tarłowych, a także wprowadzanie obcego genetycznie stada do Regi w latach 1955–1972 miały silny wpływ na stan pogłowia ryb

i zaburzyło indywidualność stada [Witkowski i inni, 2004]. Zarybienia Odry, głównie w systemie Drawy oraz dorzecza środkowego i dolnego (Noteć, Gwda), obejmowały łącznie ponad 1 mln sztuk różnych kategorii materiału zarybieniowego certy. Ze względu na produkcję materiału w różnych ośrodkach zarybieniowych (Goleniów, Maliniec, Szczodre) nie można dokładnie ustalić dróg pochodzenia materiału produkowanego na potrzeby każdej akcji zarybieniowej. W roku 2000 systematyczne zarybienia zlewni Odry rozpoczął ośrodek zarybieniowy w Szczodrem. Do roku 2007 wpuszczono tam prawie 50 tys. sztuk, w tym około 20 tys. osobników w wieku dwóch i trzech lat [Bartel i Kleszcz, 2008]. Według Wiśniewolskiego i innych [2004], gospodarka zarybieniowa powinna być oparta na pozyskiwaniu tarlaków z rzek i przewożeniu ich do ośrodków zlokalizowanych w ich pobliżu. Uzyskane w wyniku sztucznego rozrodu certy należy następnie podchowycwać w izolacji od osobników tego gatunku z innych zlewni. Po wpuszczeniu materiału do rzek macierzystych zostanie zachowana odrębność populacyjna pomiędzy zlewniami, co w dalszej kolejności pozwoli na zachowanie bioróżnorodności wewnątrzgatunkowej. Już podczas tworzenia programów restytucji certy dla Odry i Wisły szczególną uwagę zwracano na monitorowanie czystości genetycznej tarlaków oraz konieczność prowadzenia wstępnej ich selekcji pod kątem cech populacji wędrownej. Autorzy programów zarybieniowych duży nacisk kładli na zgodność genetyczną materiału zarybieniowego z populacjami certy egzystującymi w danych odcinkach rzek, nawet jeśli takie populacje były szczątkowe.

Rzeka Barycz, mająca zdecydowanie najlepsze warunki do efektywnego wsiedlenia certy do zlewni Odry, stała się miejscem bardzo intensywnych zarybień tym gatunkiem. W latach 70. XX wieku populacja certy w Baryczy była reprezentowana zaledwie przez pojedyncze osobniki. Przeprowadzona po raz pierwszy w 2000 roku dla zlewni Baryczy i Kaczawy akcja kontrolowanego rozrodu, oparta na tarlakach odłowionych z tych rzek, dała satysfakcjonujące efekty [Kleszcz i inni, 2001]. Obecnie lokalna populacja tego gatunku jest na tyle stabilna, że można odławiać co roku kilkadziesiąt sztuk tarlaków i wykorzystać je do produkcji materiału zarybieniowego [Kleszcz i Wolnicki 2002]. Jak podaje Kleszcz [2004], z przeprowadzonych wyliczeń można wnioskować, że stado tarłowe certy w Baryczy liczyło wtedy około 230 osobników. Według tego autora, jest to liczba równa liczebności pierwotnej populacji tego gatunku w momencie rozpoczęcia zarybień (lata 2000–2001). Badania nad analizą kariotypów cert pochodzących z Baryczy prowadzono już w latach 2002–2003 [Kempter i inni, 2003]. Wykazały one, że pod względem cytogenetycznym są to homogenne osobniki, a liczba chromosomów w komórkach somatycznych wynosi $2n = 50$. W populacji tej częściej niż w kariotypie standardowym pojawiały się chromosomy akrocentryczne.

Populacje certy bytujące w rzekach przymorskich, głównie w **Redze i Parsęcie**, są również ujęte w programach restytucji. Jak podają Heese i Lampart-Kałużniacka [2002], prawdopodobne jest, że w Redze występuje stacjonarny typ morfologiczny certy. Jednak ze względu na późne rozpoczęcie badań genetycznych nad tą populacją niemożliwe wydaje się określenie jej zmienności w ostatnich kilkadziesiąt latach. Obecność w tych rzekach lokalnych populacji pozwoliła na wychów materiału w ośrodkach zarybieniowych w Goleniowie i Białogardzie [Wiśniewolski i inni, 2004]. Ze względu na „przechodzenie” materiału zarybieniowego z Regi, którym zarybiano także Inę, doszło do wyprowadzenia stada macierzystego

z rzeki. Z tego powodu od 2004 roku materiał zarybieniowy przeznaczony dla dolnego odcinka Odry pochodził także z ośrodka zarybieniowego w Szczodrem. Materiał zarybieniowy wyprodukowany w Goleniowie wprowadzono do Regi w latach 1960–1985. Zarybienia wznowiono po przerwie trwającej 19 lat, w 2004 roku, przez systematyczne wprowadzanie łącznie ponad 500 tys. sztuk certy.

Kontrola prowadzenia i ocena skuteczności prac zarybieniowych prowadzona przez Radę ds. Restytucji Ryb Wędrownych wskazuje na zbyt słabo poznany stan populacji certy w Drawie, Dolnej Odrze i Redze [Raczyński i Kiriaka, 2000]. Ze względu na kluczowe znaczenie rzeki Regi w całości prac reintrodukcyjnych na Pomorzu Zachodnim, od kilku lat prowadzone są badania nad oceną zmienności międzypopulacyjnej certy w polskich rzekach (Uniwersytet Warszawski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski oraz Instytut Rybactwa Śródlądowego). Według Brzuzana i Trojnickiej [2004] badania oparte na materiale certy pochodzącej z dorzecza Odry i Wisły pozwoliły na stwierdzenie, że nie występują różnice międzypopulacyjne w obrębie zlewni, natomiast populacje tego samego dorzecza charakteryzują się znaczną zmiennością międzyosobniczą.

Certa z **Jeziora Ostrowieckiego**, leżącego na terenie Drawieńskiego Parku Narodowego, reprezentuje populację stacjonarną-słodkowodną. W latach 1999–2000 przeprowadzono tam akcję pozyskiwania tarlaków. Wyprodukowana ilość materiału umożliwiła zarybienie terenów przyujściowych rzeki [Hliwa i inni, 2000]. Akcja ta przyczyniła się do odtworzenia stada tarłowego i była ważnym krokiem w restytucji tego gatunku.

W uporządkowaniu systemu produkcji materiału zarybieniowego przeznaczonego dla zlewni Odry, Wisły i rzek przymorskich dużą rolę odegrały analizy dotyczące prognozowania efektywności zarybień certą. Obecnie, jak podają Bartel i Kleszcz [2008], dla utrzymania bioróżnorodności poszczególnych populacji certy gospodarstwa zarybieniowe są przydzielane do danych zlewni. Za produkcję materiału do zlewni Odry odpowiada więc OZ Szczodre, do Regi i Iny – OZ Goleniów, a do zlewni Wisły wytypowano siedem wyselekcjonowanych ośrodków zarybieniowych. Mając na uwadze odizolowanie w procesie produkcji poszczególnych lokalnych form certy, konsekwentnie zachowano priorytety ustanowione przez Radę ds. Restytucji Ryb Wędrownych. Zwraca ona uwagę nie tylko na ochronę bioróżnorodności międzypopulacyjnej, ale także na przywrócenie znaczenia gospodarczego certy, przez wszelkie działania służące odtworzeniu wędrownego stada tego gatunku [Buras i inni, 2004]. Bartel i Kardela [2009] w sprawozdaniu z realizacji programu restytucji certy i jesiotra ostronosego zdecydowanie sprzeciwiają się mieszanemu z różnymi zlewiskami podczas akcji zarybieniowych lub pozyskiwania ryb do tarła. Dotyczy to nie tylko certy ze zlewisk Odry i Wisły, ale także pochodzącej z Regi.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy wskazują na obecność tego samego haplotypu u osobników certy pozyskanych z Wisły, Regi, Baryczy, Parsęty, Zalewu Szczecińskiego i Jeziora Ostrowieckiego (H1). Podobne wyniki wcześniej uzyskali Brzuzan i Trojnicka [2004], którzy stwierdzili brak różnic między osobnikami certy z poszczególnych zlewni. Należy się jednak zastanowić, jak doszło do wykształcenia odmiennego genetycznie stada certy noteckiej. Czy stada, które często są opisywane jako morfologicznie i biometrycznie różnicowalne, powinny być określane mianem populacji stacjonarnych? Ryby z Noteci to

na ogół certy trasy Noteć – Warta – Odra. Jeżeli w Odrze i jej dopływach nie tworzy ona dostatecznie izolowanych populacji, to kiedy i z jakich przyczyn ukształtowała się w Noteci tak odmienna populacja tego gatunku? Wyniki niniejszych badań wskazują, że reprezentuje ona haplotyp 4 (H4). Genetycznie jest on najbardziej oddalony od wszystkich haplotypów charakteryzujących osobniki certy z wybranych państw europejskich. Interesujące jest również to, że poza Notecią nie stwierdzono takiego haplotypu u żadnych innych badanych populacji. Pomimo że dolny odcinek Noteci był trasą wędrówki tarłowej certy, którą odławiano tu w większych ilościach [Jaskowski, 1962], to już od 1999 roku nie notowano certy w Noteci, z wyjątkiem jednego osobnika, odłowionego w 2000 roku [Andrzejewski i Mastyski, 2000]. Ilościowa przewaga certy z Warty nad wszystkimi innymi dopływów Odry nie uratowała tej populacji przed wyginięciem. Jak donoszą Witkowski i inni [2004], od ponad 20 lat w Warcie nie odnotowano obecności osobników certy, pomimo akcji zarybieniowych.

5.1.3. Zmienność genetyczna certy

Analiza składu nukleotydowego oraz wysycenia poszczególnymi parami zasad fragmentu genu cyt. b nasuwa przypuszczenia o wystąpieniu zjawiska transferu poziomego tego genu. Badania ewolucji białek i genów wymagają porównywania homologów, czyli sekwencji, które charakteryzują się wspólnym pochodzeniem, wobec czego mogą one pełnić podobną funkcję. Sekwencje homologiczne, w tym przypadku reprezentujące zróżnicowane warianty genu cyt. b, są dziedziczone po wspólnym przodku, który miał sekwencję bardzo podobną, jednak z powodu znacznych modyfikacji obecnie trudną do zdefiniowania [Brinkman i Leipe, 2005]. Z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku gatunku *Vimba vimba*. Obecnie niemożliwe jest określenie wyjściowej sekwencji analizowanego genu. Przyczyną tego są ciągle modyfikacje wynikające z konieczności przystosowywania się certy do zmieniających się warunków bytowania, do których zalicza się uniemożliwienie wędrówek tarłowych, przymusowe tworzenie populacji stacjonarnych czy zmiany w składzie gatunkowym bentosu jako efekt zanieczyszczenia wód. Wszystkie te elementy wymuszały na opisywanym gatunku zwiększenie tempa dywergencji. Na specyficzną formę specjacji certy, polegającą na rozszczepieniu gatunku na dwa lub więcej taksony, może wskazywać istnienie jednorodnej populacji w Polsce, ale także obecność tego samego haplotypu (H1) w populacji bałtyckiej z Litwy i rzeki Pirity w Estonii czy pojawienie się zupełnie odrębnego haplotypu H4 w Noteci i H3 w jeziorze Traunsee w Austrii. Taki typ „ewolucji rozbieżnej” może być wynikiem przystosowania się „nowych” populacji (form?) drogą doboru naturalnego do odmiennych warunków życia. Trojnicka i inni [2003], opierając się na metodach cytotaksonomicznych, pierwotnie założyli, że na terenie Polski występują dwie odmiennie genetycznie populacje certy z dorzecza Odry i Wisły. Późniejsze prace Trojnickiej-Szczepańskiej [2005] wykazały, że certy w polskich wodach charakteryzują się wewnątrzpopulacyjnym różnicowaniem. Ewolucyjnie należą one prawdopodobnie do jednej linii. Autorka ta wskazuje również na brak ustabilizowania liczebności tych populacji w czasie ustępowania lodowca. Według niej, pojawiające się zmiany sekwencji w genomie są przyczyną kształtowania się tzw. prywatnych haplotypów. Nie są one skorelowane z dystansem geograficznym, czyli fizycznym rozdzieleniem populacji i istnieniem stałej izolacji przestrzennej.

Reasumując wyniki badań przeprowadzonych na rodzimych siedmiu populacjach z dorzecza Odry, Wisły i rzek przymorskich, nasuwa się przypuszczenie o mozaikowym charakterze ewolucji *Vimba vimba* w polskich wodach. Wielokrotnie podejmowano próby wyodrębniania nowych populacji, ras lub form tego gatunku. Sens takich zabiegów podał w wątpliwość Bontemps [1957], twierdząc, że niesłusznie utworzono dwa taksony dla certy wód podkarpackich. W tradycyjnej taksonomii za podstawę klasyfikacji organizmów uznaje się ogólne podobieństwo morfologiczne, behawioralne, rozwojowe, cytogenetyczne czy molekularne. Oznacza to, że hierarchia klasyfikacji odzwierciedla kolejność ewolucyjnego pojawiania się cech od rodziny do gatunku. Problem pojawia się wówczas, gdy nie ma analogii do tzw. kaskadyzacji cech. Wielokrotnie opisywano różne cechy morfologiczno-biometryczne (tempo wzrostu, ubarwienie, mięsistość pyska, liczbę łusek w linii bocznej, wysokość ciała), które są kluczem umożliwiającym ich klasyfikację do pozycji taksonu poniżej gatunku (populacja, rasa, odmiana, stado itp.). W każdym z tych przypadków pojawia się pytanie, na jakim poziomie ich zmienności można postawić granicę taksonomiczną? Biorąc pod uwagę tylko dane molekularne, bez uzupełnienia ich o dane z biologii i zoogeografii danego gatunku, każda podjęta próba jego sklasyfikowania będzie błędna.

Analizując prace monograficzne nad certą [Vols'kis 1970, 1976; Bontemps, 1971], można stwierdzić, że jest to gatunek charakteryzujący się olbrzymią plastycznością cech morfologicznych. Pomimo istnienia wielu populacji lokalnych, które powstały w wyniku konieczności reagowania na zmieniające się warunki środowiskowe w rzekach, w ostatnich latach drastycznie spadła liczebność tego gatunku. Należy więc ocenić możliwość wykorzystania zgromadzonych danych genetycznych certy do szybszego odbudowywania jej populacji, nie tylko pod względem liczebności, ale przede wszystkim stabilności genetycznej. Być może cenne byłoby podjęcie prób uszlachetnienia cech tego gatunku przez wykorzystywanie do wspólnego rozrodu ryb z różnych populacji. Biorąc pod uwagę z jednej strony wysoką homogenność populacji z dorzecza Odry i Wisły oraz rzek przymorskich, z drugiej zachowaną względnie dużą zmienność w obrębie tych populacji, wydaje się to warte sprawdzenia. Różnicowanie w obrębie mtDNA następuje do 10 razy szybciej niż w obrębie DNA jądrowego [Łuczyński i inni, 2003]. Wynika z tego, że polskie populacje certy, z wyjątkiem certy noteckiej, mogą być swobodnie traktowane jako materiał jednorodny. Zabiegi łączenia dotychczas izolowanych cech populacji prowadzono już w byłym ZSRR, gdy certę z Jeziora Pskowsko-Czudskiego traktowano jako potencjalnie „lepszy” materiał do produkcji materiału zarybieniowego dla zlewni Wisły [Wajdowicz, 1967].

Dotychczasowe zabiegi w ramach akcji tarłowych, gdy izolowano tarlaki z różnych zlewni, pomimo znaczących zarybień (zob. tabele 2 i 3), nie przyniosły oczekiwanych rezultatów w postaci wzrostu udziału certy w połowach. Czas przeznaczony na wzmocnienie populacji certy wynosi 7–10 lat ze względu na dość późne osiągnięcie dojrzałości płciowej oraz konieczność odbycia wędrówki tarłowej. Dzisiaj pojawia się już wątpliwość, czy należy kontynuować akcje zarybieniowe, czy też skuteczniejszym zabiegiem będzie udrożnienie rzek, a tym samym umożliwienie tarlakom wędrówkę na tarliska [Bartel i Kleszcz, 2008]. Analizując gen cyt. b, stwierdzono, że wysycenie poszczególnymi zasadami (A, T, G, C) w dwóch haplotypach (H1 i H4) jest zdecydowanie różne. Jak ilustruje rysunek 11, procen-

towy udział adeniny i tyminy jest zdecydowanie wyższy u certy z haplotypem H1 (Wisła, Rega, Barycz, Parsęta, Zalew Szczeciński i Jezioro Ostrowieckie) niż u certy noteckiej (H4). Udział guaniny w obu haplotypach jest porównywalny, a cytozyna w genie cyt. b u certy noteckiej ilościowo zdecydowanie przewyższa jej zawartość w haplocybie 1. Znaczenie zmiany wysycenia genu nukleotydami G + C wskazuje na obecność ksenologu genu cyt. b u certy noteckiej. Może to wynikać z długiej izolacji ryb i związanego z tym rozrodu w zamkniętej grupie tych samych osobników, trwającego przez wiele lat. Może też świadczyć o zewnętrznym pochodzeniu tego genu [Brinkman i Leipe, 2005], co w przypadku certy jest mało prawdopodobne. Po analizie ewolucji karpiowatych, określanej jako ewolucja mozaikowata lub wyspowa, należy sądzić, że funkcja ksenologu genu występującego u certy noteckiej jest podobna do genu wyjściowego. Odmienność sekwencji wynika najprawdopodobniej z utrwalenia mutacji na drodze krzyżowania się małej liczby osobników.

Istnienie takich różnic na poziomie jednego genu skłania do zaproponowania ośrodkom zarybieniowym eksploatacji tarlaków reprezentujących oba haplotypy. Przeprowadzenie takiego programu hodowlanego pozwoliłoby wykorzystać potencjał obu populacji certy. Zgodnie z zasadą prac selekcyjnych, stosowanie selekcji rodzinowej jest uzasadnione w przypadku chęci doskonalenia cechy o niskiej odziedziczalności [Łuczyński, 2005]. Mając do dyspozycji praktycznie dwa genetycznie odmienne stada certy (notecką i pozostałe), należałoby wykorzystać możliwość utrwalenia cech osobników o zwiększonej odporności na choroby lub obniżonej podatności na zabiegi hodowlane. Cytochromy są białkami biorącymi udział w transporcie elektronów w łańcuchu oddechowym. Można zatem wnioskować, że zmiany zachodzące na poziomie składu nukleotydowego w genie odpowiedzialnym za pozyskiwanie energii przez komórkę wpływają na stan energetyczny komórek, a tym samym na kondycję całego organizmu. Główną funkcją pobieranego tlenu jest utrzymanie cytochromów w stanie utlenienia [Minakowski i Weidner, 1998]. Stres lub infekcja powodują u ryb brak/niedobór tlenu, co hamuje prawidłowe funkcjonowanie łańcucha oddechowego w komórkach. Wzmocnienie cech gatunkowych, tzw. wigor mieszańców, jest możliwe w pracach hodowlanych przez krzyżowanie osobników różniących się między sobą. Prace selekcyjno-hodowlane oparte na krzyżowaniu odseparowanych linii ryb prowadzono na karpiowatych (Cyprinidae), łososiowatych (Salmonidae), sumowatych (Ictaluridae) oraz wybranych gatunkach tilapii (*Oreochromis* sp.). Efekt heterozji udało się uzyskać jedynie dla wyselekcjonowanych linii karpia [Moav i inni, 1975] i suma kanałowego (*Ictalurus punctatus*) [Dunham, Smitherman, 1983; Dunham, 1987]. U łososia atlantyckiego również potwierdzono efekt heterozji [Gjerde i Refstie, 1984], który był jednak zdecydowanie niższy niż wśród ryb karpiowatych. Krzyżowanie odmiennych linii tego samego gatunku dało zadowalające efekty w przypadku oceny odporności na choroby. Szczególnie obiecujące wyniki uzyskali Myklebust i Hedrick [2006]. Autorzy ci poddali eksperymentalnemu zarażeniu *Myxobolus cerebralis*, udomowioną i dziką linię pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). U kilku z 32 przeprowadzonych krzyżówek stwierdzono efekt podwyższonej odporności na zarażenie pasożytem. Innym aspektem selekcji ukierunkowanej było tempo wzrostu ryb, odporność na gyrodaktylozę (*Gyrodactylus*) oraz infekcje grzybicze u karpia. Suzuki i Yamaguchi [1980] dowiedli, że dzięki zastosowanej technice krzyżowania uzyskano osobniki charakteryzujące

się szybszym wzrostem i niższym współczynnikiem wykorzystania paszy niż osobniki rodzicielskie wybrane do rozrodu. Ponadto u krzyżówek stwierdzono zwiększoną odporność na patogeny i obniżoną śmiertelność, co w efekcie skutkowało uzyskaniem lepszych wyników ekonomicznych w hodowli.

Ocena stopnia zróżnicowania genetycznego populacji w aspekcie ochrony gatunków zagrożonych była celem badań wielu ichtiologów. Szczególne miejsce zajmuje tutaj karpio-wata ryba słodkowodna świnka (*Chondrostoma lusitanicum*), gatunek charakteryzowany jako krytycznie zagrożony. Sousa i inni [2008] poddali analizie molekularnej kilka populacji świnki z różnych obszarów jej występowania. Uzyskane wyniki zostaną wykorzystane do opracowania systemu aktywnej ochrony tego gatunku. Ocena wzmocnienia populacji pstrąga tęczowego materiałem produkowanym z udziałem pozyskanych tarlaków (efekt naturalizacji) przeprowadzili Miller i inni [2004]. Autorzy ci sugerują, że stałe zarybianie lub przenoszenie ryb między lokalizacjami może nie być w pełni zgodne z założeniami naturalizowania populacji. Należałoby zatem szerzej rozważyć korzyści i zagrożenia, które mogą być skutkiem takich działań środowiskowych.

Mając na uwadze zarówno korzyści (szybszy wzrost, większa odporność na patogeny), jak i zagrożenia (niespójne działania w polityce zarybieniowej), należy bardzo ostrożnie podchodzić do poszczególnych planów zarybieniowych, mających na celu ochronę gatunków zagrożonych. W tym kontekście przetransportowanie mtDNA od certy pochodzącej z Noteci i skrzyżowanie jej z samcami z innej zlewni (Wisły?) lub rzek przymorskich spowodowałyby utrwalenie formy allelicznej H4. Według badaczy zajmujących się biologią i rozrodem certy z ciągu Odra – Warta – Noteć – Drawa [Witkowski i inni, 2004], jest to jedyna populacja, której liczebność stale rośnie. Można zatem sądzić, że jest to jednocześnie jedyna populacja, która ma szansę przetrwać bez zabiegów sztucznego jej zasilania (zarybiania).

Intensywne zarybianie rzeki Barycz, prowadzone od wielu lat przez OZ Szczodre, spowodowało znaczny wzrost liczby dorosłych osobników certy obu płci łowionych na tarliskach. Pozwala to wnioskować, że masowe zarybienia tego odcinka dorzecza Odry zaczynają przynosić zakładany, praktyczny skutek. Wyniki te, dzięki ich naukowemu podłożu (znakowanie, liczenie, odłowy kontrolne), to ogromny zasób informacji, który powinien być wykorzystany do aktywnej ochrony tego gatunku. Kleszcz [inf. ustna, listopad 2009] uważa, że obecne zróżnicowanie genetyczne certy w Polsce nadal jest tylko wynikiem ich naturalnego rozrodu. Pozyskany do niniejszych badań haplotyp H4 populacji noteckiej jest najprawdopodobniej efektem odłowienia do badań osobników wprowadzonych do rzeki w 1996 roku.

Pewne wątpliwości nasuwają się podczas studiowania definicji bioróżnorodności. Jak należy bowiem rozumieć możliwość ochrony gatunków poprzez „restytucję i odtworzenie zagrożonych gatunków oraz ich ponowne wprowadzenie do ich naturalnych siedlisk przy zachowaniu odpowiednich warunków”? [Konwencja o bioróżnorodności biologicznej, art. 9]. Zagrożony gatunek, będący z definicji mało liczebny i/lub ulegający degradacji genetycznej związanej z izolacją powodowaną przez np. zapory na rzekach, trudno jest odtworzyć przez ochronę tylko i wyłącznie jego lokalnych populacji. W polskiej Czerwonej księdze zwierząt certa jest ujęta jako gatunek *Vimba vimba*, a nie jako jego poszczególne, lokalne populacje. Jak wynika z podejmowanych prób restytucji certy w Polsce, oprócz regularnych zarybień

trzeba tworzyć żywy bank genów. Będzie to możliwe wówczas, gdy równolegle zostaną przeprowadzone prace selekcyjne i tym sposobem pozyskane stada tarlaków o odpowiedniej liczebności (powyżej 120 sztuk), gwarantujące minimalizację krzyżowania ze sobą osobników spokrewnionych [Wiśniewolski, 2007]. W tym celu do każdej zlewni należy przypisać ośrodki zarybieniowe produkujące materiał dla rzeki macierzystej na podstawie pozyskanych z niej tarlaków. Programy hodowlane oparte na bardzo ograniczonej liczbie tarlaków rodzą ryzyko otrzymania słabego pod względem cech przystosowawczych materiału. Mutacje, które pojawiają się w takiej populacji, praktycznie są utrzymywane na stałym poziomie. Jednak potencjalnie częstotliwość ich pojawiania się może wzrastać. Odpowiedzialne są za to podstawowe mechanizmy dziedziczenia, oparte na ograniczonej puli genowej materiału wyjściowego, czyli tarlaków, oraz tzw. efekt kumulacji mutacji w mitochondrialnym DNA. Wobec tego należy zastanowić się nad wzmocnieniem gatunku „od góry” przez wykorzystanie do tarła samic z Noteci (H4) i odległych genetycznie samców z Wisły (H1) lub nawet z populacji z Dunaju (H2) czy rzeki Kolpy w Słowenii (H2). Badania nad oceną kondycji pozyskanego materiału, jego przeżywalnością i odpornością na choroby, przeprowadzone w warunkach kontrolowanych, miałyby istotne znaczenie praktyczne. Wiedza na ten temat mogłaby się przyczynić do wyprowadzenia stabilnych populacji, a tym samym do wzmocnienia puli genowej ginącego gatunku. Lokalne populacje powinny być wspierane, jeśli gatunek, który reprezentują, jest „silny” zarówno pod względem naturalnej produktywności, jak i ogólnego stanu kondycji biologicznej. Wątpliwości wynikające z prowadzonych w Polsce zarybień przedstawiają w swoim opracowaniu Bartel i Kleszcz [2008], stawiając pytanie: czy należy zarybiać, czy przerwać zarybianie i oczekiwać aż przyroda sama sobie poradzi? Podsumowując powyższe rozważania, można stwierdzić, że zarybianie certą na dotychczasowych zasadach (pełna izolacja populacji) sprowadza się do ilościowego wzmocnienia populacji. Wątpliwości jednak budzą próby oceny uzyskania celu nadrzędnego, jakim jest ochrona gatunku *Vimba vimba*. Ilość produkowanego przez kilka polskich ośrodków materiału zarybieniowego certy jest liczona w milionach sztuk. Wydaje się słuszne, że obecny rozwój i zoptymalizowanie technologii chowu materiału zarybieniowego mogą posłużyć do podjęcia oceny kondycji wymieszanych stad tarłowych, reprezentujących odmienne haplotypy.

Wyniki badań dowodzą, że w wodach Polski i Czech oprócz formy noteckiej występuje homogenny materiał certy. Jej populacje są niestabilne genetycznie i mają ujemną wartość w teście Tajima, ponadto są mało liczebne i wymagają podjęcia szybkich działań wzmacniających gatunek. Jak podają Raczyński i Keszka [2007], populacja certy z systemu dolnej Odry jest w regresie. Inne populacje również są mało liczebne, a certa pozyskiwana w połowach gospodarczych na terenie Polski jest w dalszym ciągu określana jako przyłów. Według najnowszych danych oceniających stopień zagrożenia słodkowodnej ichtiofauny Polski gatunek ten jest definiowany jako krytycznie zagrożony (CR) [Witkowski i inni, 2009]. W porównaniu z innymi krajami europejskimi, z których materiał wykorzystano do badań, klasyfikuje to certę na najwyższym szczeblu zagrożenia, co oznacza, że w Polsce jest to nadal gatunek wymagający intensywnych zabiegów ochronnych.

5.2. Analiza zmienności wybranych europejskich populacji a program ochrony gatunku

Biorąc pod uwagę trwające programy zarybieniowe w rzekach Polski oraz obecność certy w wielu rzekach Europy, należy się zastanowić, kiedy i w jakich warunkach dochodzi do powstawania form lokalnych, które mają predyspozycje do genetycznego utrwalenia cech. Jak twierdzą systematycy [Freyhof, inf. ustna], nie zawsze tworząca się forma lokalna, która ma cechy pozwalające na jej identyfikowanie (głównie różnice morfologiczne), powinna mieć rangę podgatunku. Jest to tłumaczone brakiem ciągłości utrzymywania się danych cech po przeniesieniu ryb do innego zbiornika. Wpływ środowiska na tworzenie różnorodności wewnątrzgatunkowej (populacje, stada, rasy, formy) nie zawsze ma szansę na utrwalenie w genotypie osobnika na skutek zbyt krótkiego czasu działania konkretnego czynnika. Problem atrakcyjności cech pod kątem ich użyteczności taksonomicznej rozważało wielu autorów [Balon i inni 1986, 1992; Uiblein i Winkler, 1994; Freyhof, 1999; Keszka i Krzykowski, 2008; Wysujack i inni, 2009]. Są tzw. sławne populacje certy, od wielu lat opisywane jako szczególne formy endemiczne. Do takich zaliczana jest populacja certy z jezior podalpejskich, która ma wiele cech przystosowawczych i różni się od „certy wędrownej”. Prawdopodobnie obecność odróżnialnych cech plastycznych jest wynikiem skrajnej izolacji (struktura jezior alpejskich) obecnych tam populacji tego gatunku. Jak podkreślają Kottelat i Freyhof [2007], populacje te wymagają jednak badań genetycznych, które pozwoliłyby ustalić polimorficzność i genetyczną odmienność (lub podobieństwo) od certy wędrownej *Vimba vimba* z wód Europy. Certy z jezior Bawarii i górnej Austrii są określane jako certy jeziorowe (*Vimba elongata*). W Austrii gatunek ten jest zaliczany do zagrożonych, a pod względem użyteczności gospodarczej uznany za rzadki gatunek towarzyszący połowom [KIS, 2008]. Certy z alpejskiego jeziora Traunsee reprezentują niespotykany gdzie indziej haplotyp 3 (H3). Na drzewie ilustrującym zależności filogenetyczne (rys. 12) widać, że haplotyp ten jest najbardziej zbliżony do haplotypu drugiego (H2) osobników certy z Dunaju. Rzeką Traun wpada do Dunaju na wysokości miasta Linz, dlatego podobieństwo to jest nie tylko efektem ograniczonej izolacji. Charakter jezior alpejskich, głównie ich termika i bardzo wartki nurt rzek zasilających, determinuje inny sposób gospodarowania energią, niż jest to u cert reprezentujących formy stacjonarne. Cytochrom b bierze udział w łańcuchu oddechowym i jako pierwszy składnik układu cytochromowego odpowiada za przenoszenie elektronów, gwarantując komórce pozyskanie energii. Zbadanie składu nukleotydowego genu odpowiedzialnego za syntezę tego białka pozwoliło na analizę porównawczą jego struktury w poszczególnych populacjach. Sekwencja genu cyt. b wykazuje duże podobieństwo między haplotypami 2 i 3, szczególnie w procentowym składzie poszczególnych nukleotydów. Jak przedstawiono na rysunku 11, procentowy udział wszystkich zasad nie przekracza zróżnicowaniem 0,1%. Porównując haplotyp certy podalpejskiej (*subalpine vimba*) z populacją najdalszą genetycznie (H4), można przypuszczać, że zróżnicowanie wynikające z analizowanej sekwencji genu cyt. b jest efektem jego silniejszej ekspresji u cert charakteryzujących się znacznie większym zapotrzebowaniem na energię. Cechy jeziora Traunsee (191 m głębokości) determinują swoisty skład ichtiofauny i umożliwiają występowanie takich gatunków, jak troć, palia, szczupak (*Esox*

lucius) oraz – co wydaje się wyjątkowe – również certa. Warunki wymusiły na niej prawdopodobnie modyfikację metabolizmu i wytworzenie specyficznego systemu gospodarowania energią, co zostało przetransformowane na sekwencję genu odpowiedzialnego za syntezę cytochromu. Badania porównawcze certy jeziorowej z dunajską [Uiblein i Winkler, 1994] wskazują na możliwość zróżnicowania tylko podgatunku *Vimba vimba elongata*, a nie gatunku *Vimba elongata*. Na opublikowanej liście 50. najbardziej zagrożonych gatunków w Austrii widnieje również gatunek *Vimba elongata*. Władze Austrii kładą szczególny nacisk na jego ochronę nie tylko z powodu ograniczonej liczebności tej endemicznej populacji, ale także ze względu na obecność budowli hydrotechnicznych zlokalizowanych właśnie na jeziorze Traunsee. W cytowanym raporcie gatunek *Vimba vimba* jest określany jako szeroko rozprzestrzeniony w wodach Austrii. Według Wanzenböcka [inf. ustna], certa nigdy nie była wsiedlana do zespołu jezior Mondsee, Traunsee i innych jezior alpejskich, a osobniki, które tam bytują, reprezentują naturalną populację tego gatunku. W Austrii jest ona oceniana jako ryba o średnich walorach kulinarnych i nie jest przedmiotem akcji zarybieniowych. Należy przyjąć, że certa w wodach Austrii jest stale obecna, mimo że nie jest objęta żadnym programem restytucji.

Zróżnicowaną populację tworzą certy pozyskane z Dunaju na wysokości miasta Passau, w bawarskiej części Niemiec. Reprezentują one dwa haplotypy: H1 – obecny w rzekach Polski, Zalewie Kurońskim na wysokości Kłajpedy, czeskiej Jihlavy i niemieckiej rzecze Eder, zlewni Wezery uchodzącej do Morza Północnego, oraz zupełnie nowy haplotyp 2 (H2), spotykany jedynie u cert pozyskanych w Dunaju. Został on przypisany do 57,2% osobników. Obecność dwóch różnych haplotypów w jednej populacji zaobserwowano tylko u cert z Dunaju i słoweńskiej Kolpy. Certy z Dunaju były porównywane przez Wajdowicza [1974]. Już wówczas dopatrywano się różnic na poziomie morfologicznym. Wajdowicz charakteryzował certy z Dunaju jako „certy z bardziej wyciągniętym nosem” w porównaniu z tymi z Wisły. W niniejszych badaniach spośród przeanalizowanych genetycznie osobników z Dunaju prawie połowa miała scharakteryzowany również w Wiśle haplotyp H1.

Zupełnie inną sytuację zaobserwowano u cert pochodzących z estońskiej Pirity, ósmej pod względem wielkości rzeki w Estonii, wpadającej do Morza Bałtyckiego. W Rządowym raporcie Estonii, Litwy i Łotwy [World Conservation Union, 1993], poświęconemu pracom nad ochroną zwierząt w Europie Wschodniej, certę zaliczono do gatunków szczególnie zagrożonych. Jako przyczynę takiego stanu wymieniono przerywanie ciągłości rzek przez konstrukcje hydrotechniczne, a tym samym niszczenie i ograniczanie temu gatunkowi dostępu do tarlisk. Badania prowadzone na Litwie opierają się głównie na określeniu stopnia zróżnicowania subpopulacji certy [Kesminas i inni, 1999] oraz określaniu składu biochemicznego mięsa wybranych gatunków ryb [Repečka, 1996]. Na Litwie i w Estonii certa jest obszernie opisywana w wielu monografiach ichtiologicznych, głównie jednak są to dane połowowe. Próby szczegółowego scharakteryzowania populacji litewskich podjęli się Bozhko i Smirnov [1976], wskazując na ich odrębność morfofizjologiczną od certy tradycyjnej. Jednak, jak twierdzi Lebienka [1988], „certa na molekularno-biologicznym i molekularno-genetycznym poziomie jest praktycznie niezbadanym gatunkiem, choć służy badaniom modelowym w szacowaniu produktywności poszczególnych obszarów/zlewni”. W tabeli 9 widać, że niecałe 10% osobników z rzeki Pirity charakteryzowało się niespotykanym w żadnej innej populacji

haplotypem 5 (H5). Jest on szczególnie bliski filogenetycznie haplotypowi 1, szeroko rozprzestrzenionemu w wodach Europy Środkowej. Być może certa z Purity to dobry materiał do przeprowadzenia doświadczalnych akcji rozrodczych i oceny kondycji pozyskanego materiału. Certy z terenu byłych krajów ZSRR były już sprowadzane do Polski. Nie ma jednak danych na temat ich odporności na choroby, oceny wrażliwości na zabiegi hodowlane czy zróżnicowanie tempa wzrostu.

Ciekawe wyniki uzyskano podczas analizy materiału z tureckiej rzeki Büyük Menderes, biegnącej przez teren zachodniej Anatolii i mającej ujście w Morzu Egejskim. Jak podaje Heese [2000], jest to tzw. certa bałkańska (*Vimba melanops*), zasiedlająca wybrane dopływy Morza Egejskiego. Ze względu na ograniczoną ilość materiału pozyskanego do badań nie było możliwe sekwencjonowanie fragmentu genu cyt. b. Analiza restrykcyjna, wykazała jednak, że jest to bardzo odmienna genetycznie certa, której status ciągle budzi wątpliwości. Ozer i Ozturk [2005] określają gatunek poławiany w zachodniej Turcji jako *Vimba vimba tenella*, czyli gatunek rodzimy dla wód Turcji. Również w opracowaniach stanu ichtiofauny wód Anatolii [Ugurlu i Polat, 2008] certa (*Vimba vimba*) jest zaliczana do gatunków rodzimych, reprezentujących jedną z 26 rodzin ryb słodkowodnych. Być może dobre efekty dałoby przeprowadzenie zaproponowanej akcji rozrodczej z wykorzystaniem tarlaków z Dunaju i Kolpy. Praktyki krzyżowania osobników reprezentujących różne genotypy w obrębie gatunku prowadzono dla karpia w aspekcie odporności na erythrodermatitis [Sovenyi i inni, 1988]. Wykazały one, że poszczególne genotypy różniły się pod względem odporności na ten patogen. Jest to ważny czynnik, który powinien być uwzględniany w selekcji tarlaków. Badania o podobnym zakresie prowadzono w Norwegii na różnych populacjach dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua*). Oprócz podwyższonej odporności na choroby obserwowano także większe tempo wzrostu i wyższą przeżywalność. Gjerde i inni [2004] twierdzą, że należy pozyskać osobniki dorsza z różnych regionów geograficznych Norwegii celem oszacowania różnic na poziomie genetycznym między naturalnymi populacjami. Dopiero na tej podstawie będzie można wyselekcjonować podstawową populację, umożliwiającą rozpoczęcie programu sztucznego rozrodu tej ryby. Według Bekkevold i innych [2006], wskazówek do prac nad selekcją stad tarłowych dorsza udzieliły zespoły badawcze opracowujące programy selekcyjne dla łososia atlantyckiego. Wyniki ich badań [Hindar i inni, 1991; Hansen, 2002] zmieniły strategię zarządzania pulą genetyczną tego gatunku. Bekkevold i inni [2006] sądzą, że ryby dorszowate pochodzące z izolowanych populacji mogą się różnić tempem wzrostu lub odpornością na pasożyty i dlatego aspekty te powinny być brane pod uwagę podczas selekcji tarlaków w programach hodowlanych. Możliwość tworzenia stad tarłowych na podstawie selekcji pojedynczych osobników, ich potomstwa, przodków, współczesnych krewnych lub użycia kombinacji z rodzicami o innym genotypie popierają Banerjee i inni [2008]. Według tych autorów, właściwe zastosowanie metod w programach hodowlanych może dać wiele korzyści (ekonomicznych, estetycznych lub ekologicznych), których podtrzymywanie dzięki wykorzystaniu odpowiedniego stopnia zmienności genetycznej jest pomocne w zachowaniu gatunków. Zmienność populacji ryb w obrębie różnych rzek w Brazylii analizowali Povh i inni [2008]. Wysoki poziom genetycznego zróżnicowania między rybami wypuszczanymi podczas realizacji programów zarybieniowych a populacjami naturalnie występującymi w tych zbiorni-

kach może powodować, że ważne geny, odpowiedzialne za adaptację do lokalnych warunków środowiskowych, zostaną utracone. Wszelkie akcje zarybieniowe podejmowane bez wsparcia naukowego mają więc niską wydajność. Mogą być przyczyną obniżenia zróżnicowania genetycznego w obrębie populacji oraz prowadzić do nieodwracalnych zmian w następnych pokoleniach ryb. Z tego powodu użycie markerów molekularnych do oceny zmienności w obrębie populacji [Avisé, 2008] w trakcie monitoringu może się przyczynić do utrzymania kondycji w populacji ryb [Povh i inni, 2008].

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki dzięki genetycznemu scharakteryzowaniu kilku populacji certy dały podstawę do stworzenia zróżnicowanych stad tarłowych i być może skuteczniejszej w przyszłości formy ochrony gatunku *Vimba vimba*. Porównanie jej populacji z wielu obszarów Europy umożliwia stworzenie zintegrowanego programu ochrony nie tylko na poziomie populacji czy stada, ale na poziomie certy jako gatunku anadromicznego. Ważne jest bowiem to, że zachowanie cech gatunku jest możliwe nie tylko przez ochronę wyłącznie małych, nawet bardzo wyjątkowych populacji lokalnych, ale przede wszystkim przez obniżenie stopnia inbrodu i zwiększenie bioróżnorodności w obrębie samego gatunku.

6. Wnioski

1. Analiza restrykcyjna wykazała przydatność enzymów EcoRI, HinfI, Hin6I i Ssi do różnicowania poszczególnych populacji certy w procesie trawienia fragmentu genu cyt. b ograniczonego starterami Vimba1 (= L15267) i Vimba2 (= H16526).

2. Zastosowanie trzynastu enzymów restrykcyjnych, w tym dziesięciu tnących sekwencję referencyjną AY 026404, umożliwiło wyłonienie pięciu haplotypów w grupie piętnastu analizowanych populacji.

3. Populacjami homogennymi okazały się certy z Wisły, Regi, Baryczy, Parsęty, Zalewu Szczecińskiego, Jeziora Ostrowieckiego, Jihlavy (Czechy), Eder (Niemcy) i Zalewu Kurońskiego u wybrzeży Litwy.

4. Więcej niż jeden haplotyp w obrębie populacji stwierdzono u ryb z Pirity (Estonia), Kolpy (Słowenia) i górnej części Dunaju (Niemcy), co świadczy o ich znacznym zróżnicowaniu genetycznym.

5. W całej przebadanej grupie ryb stwierdzono jeden przypadek haplotypu H5, który można uznać za haplotyp prywatny. Możliwość oznaczenia dodatkowego haplotypu w obrębie populacji rzeki Pirity, uprzednio traktowanego jako prywatny, prawdopodobnie będzie wzrastała wraz z liczebnością próby ryb, traktowanej jako populacja z tej rzeki.

6. Analiza sekwencji genu cyt. b wykazała przydatność regionów ograniczonych pozycjami nukleotydów 37–472 oraz 110–688 w konstruowaniu primerów służących do identyfikacji poszczególnych haplotypów.

7. Najbardziej zakonserwowanym rejonem genu cyt. b u badanych osobników certy był drugi fragment ograniczony nukleotydami w pozycjach 607 do 671. Może się on okazać bardzo przydatny do odróżniania międzygatunkowych krzyżówek certy podczas selekcji tarlaków.

8. Dla wszystkich wyróżnionych haplotypów stopień wysycenia analizowanego fragmentu genu był wyraźnie wyższy dla adeniny i guaniny, a w przypadku cytozyny niższy w porównaniu z sekwencją referencyjną. Wskazuje to na znaczną liczbę transformacji w obrębie genu, mogących powodować zmiany w strukturze syntetyzowanego cyt. b.

9. Najwyższą zmienność nukleotydową w porównaniu z sekwencją referencyjną stwierdzono u osobników noteckich, reprezentujących haplotyp 4 (H4).

10. Zbadane polskie populacje certy znajdują się w regresie genetycznym, co zapewne ma wpływ na skuteczność zarybień.

11. Mając na uwadze poziom zróżnicowania cert z rzek Kolpy (Słowenia) i Dunaju (Niemcy) oraz jeziora Traunsee (Austria), należy przeprowadzić próbę wewnątrzgatunkowego krzyżowania z polskimi populacjami (certą notecką i „pozostałą” reprezentującą haplotyp pierwszy), celem pozyskania stabilnego genetycznie materiału zarybieniowego.

Piśmiennictwo

- AKASAKI T., YANAGIMOTO T., YAMAKAMI K., TOMONAGA H., SATO S. 2006. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene in cod fish (order Gadiformes) products. *Journal of Food Science* 71, 190–195.
- ANDRZEJEWSKI A., MASTYŃSKI J. 2000. Vimba (*Vimba vimba* L.) in the river basin of middle Warta and Noteć. *Sci. Pap. Agricult. Univ. Poznań, Animal Sci.*, 2, 3–9. W: A. Witkowski, T. Penczak, J. Kotusz, M. Przybylski, A. Kruk, J. Błachuta 2007. Reofilne ryby karpioiwate dorzecza Odry. *Roczniki Naukowe Polskiego Związku Wędkarskiego* 20, 5–33.
- ARANISHI F., OKIMOTO T., IZUMI S. 2005. Identification of gadoid species (Pisces, Gadidae) by PCR-RFLP analysis. *Journal of Applied Genetics* 46 (1), 69–73.
- AVISE J.C., BALL R.M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concept and biological taxonomy w: Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja. J.C. Avise (red.), 2008.
- BALON A.K., CRAWFORD S.S., LELEK A. 1986. Are there sympatric forms of Vimba Fitzinger 1873 in the Danube near the future connection to the main River? *Senckenbergiana biologica* 67 4/6, 231–248.
- BALON E.K. 1992. How dams on the River Danube might have caused hybridization and influenced the appearance of a new cyprinid taxon. *Environmental Biology of Fishes* 33, 167–180.
- BĀNĀRESCU P., PAPADOPOL M., MIKHAILOVA L. 1970. Systematics w: Biology and fisheries of Vimba in Europe. Institute of Zoology and Parasitology, The Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Wilno, 69–102.
- BANERJEE T., RAJ K.D., MISRA V. 2008. Conservation of Natural Fish Population. Proceedings of Taal 2007: The 12th World lake Conference, 562–567.
- BARTEL R. 1992. Ryby anadromiczne w ichtiofaunie Polski. *Komunikaty Rybackie* 2, 22–25.
- BARTEL R. 2002. Ryby dwuśrodowiskowe, ich znaczenie gospodarcze, program restytucji tych gatunków. *Supplementa ad Acta Hydrobiologica* 3, 37–55.
- BARTEL R., KARDELA J. 2009. Realizacja programu restytucji certy (*Vimba vimba* L.) i jesiotra ostro-nosego (*Acipenser oxyrhynchus* M.) w 2007 r. *Komunikaty Rybackie* 2, 25–27.
- BARTEL R., KLESZCZ M. 2008. Zarybianie rybami wędrownymi w Polsce. *Użytkownik Rybacki – Nowa Rzeczywistość PZW*, 127–133.
- BEKKEVOLD D., HANSEN M.M., NIELSEN E.E. 2006. Genetic impact of gadoid culture on wild fish populations: prediction, lessons from salmonids, and possibilities for minimizing adverse effects. *Journal of Marine Science* 63, 198–208.
- BONTEMPS S. 1955. Połowy certy w Polsce. *Gospodarka Rybna* 9, 11–13.
- BONTEMPS S. 1957. Zwróćmy uwagę na tarło certy. *Gospodarka Rybna* 6, 14–16.
- BONTEMPS S. 1960. Ocena stanu pogłowia certy z systemu rzeki Wisły. *Roczniki Nauk Rolniczych* 75-B-2, 179–207.
- BONTEMPS S. 1969. Wędrówka potarłowa certy (*Vimba vimba* L.) z Sanu. *Roczniki Nauk Rolniczych* 90-H-4, 639–645.
- BONTEMPS S. 1971. Certy. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 216.
- BOROŃ A. 2001. Zróżnicowanie chromosomowe ryb z rodzaju Cobitis (Pisces, Cobitidae) występujących w Polsce. Wydawnictwo UWM, Olsztyn.
- BOZHKO A.M., SMIRNOV V.S. 1976. Reflection of ecological peculiarities in morphophysiological indices of different Vimba populations. W: Vimba. Complex studies in several parts of the distribution area. R.S. Volskis (red.), Institute of Zoology and Parasitology, The Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Wilno 1976, 68–69.

- BRINKMAN F., LEIPE D. 2005. Analizy filogenetyczne. W: Bioinformatyka. Podręcznik do analizy genów i białek. A.D. Baxevanis, B.F.F. Ouellette (red.), Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 506.
- BRIOLAY J., GALTIER N., BRITO R.M., BOUVET Y. 1998. Molecular phylogeny of Cyprinidae inferred from cytochrome b DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9 (1), 100–108.
- BROWN T.A. 2001. Genomy. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 472.
- BRZUZAN P. 1996. Badania mitochondrialnego genomu siei (*Coregonus lavaretus*) przy użyciu enzymów restrykcyjnych. *Komunikaty Rybackie* 6, 14–16.
- BRZUZAN P., TROJNICKA E. 2004. Genetic variation of the Vimba (*Vimba vimba* L.) populations from the Vistula and Oder river system. *Archives of Polish Fisheries* 12 (2), 243–246.
- BURAS P., WIŚNIEWOLSKI W., BŁACHUTA J., BŁACHUTA J., BONTEMPS S., HEESE T. 2004. The east european bream *Vimba vimba* (L.) of the Vistula River Drainage: History, current status and perspectives. *Archives of Polish Fisheries* 12 (2), 117–130.
- CHANG Y.S., HUANG F.L., LO T.B. 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution* 38 (2), 138–155.
- CHENG Q., MA CH., CHENG H., ZHANG Q. 2008. Mitochondrial DNA diversity of *Coilia mystus* (Clupeiformes: Engraulidae) in three Chinese estuaries. *Environmental Biology and Fishes* 83, 277–282.
- CRACRAFT J. 1983. Species concepts and speciation analysis. W: Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja. J.C. Avise (red.), 2008.
- CUNHA C., MESQUITA N., DOWLING T.E., GILLESST A., COELHO M.M. 2002. Phylogenetic relationships and American cyprinids using cytochrome b sequences. *Journal of Fish Biology* 61, 929–944.
- DUNHAM R.A. 1987. American catfish breeding programs. Proc. *World Symp. On Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*. W: W. Knibb, G. Gorshkova, S. Gorshkov, Selection and crossbreeding in Mediterranean cultured marine fish. Tropical Mariculture. Academic Press, London.
- DUNHAM R.A., SMITHERMAN R.O. 1983. Response to selection and realized heritability for body weight in three strains of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, grown in earthen ponds. *Aquaculture* 33, 89–96.
- Estonian Red Data Book. 2007.
- FREYHOF J. 1999. Records of *Vimba vimba* (Teleostei, Cyprinidae) in the River Rhine and its tributaries. *Folia Zoologica* 48 (4), 315–320.
- FREYHOF J. 2009. Rote Liste der Süßwasser reproduzierenden Neunaugen und Fische (Cyclostomata & Pisces). Fünfte Fassung. *Naturschutz und Biologische Vielfalt* 70, 1, 291–316.
- FREYHOF J., LIECKFELDT D., PITRA CH., LUDWIG A. 2005. Molecules and morphology: Evidence for introgression of mitochondrial DNA in Dalmatian cyprinids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37, 347–354.
- GJERDE B., REFSTIE T. 1984. Complete diallel cross between five strains of Atlantic salmon. *Livestock Prod. Sci.* 11, 269–283. W: W. Knibb, G. Gorshkova, S. Gorshkov. Selection and crossbreeding in Mediterranean cultured marine fish. Tropical Mariculture. Academic Press, London (in press).
- GJERDE B., TERJESEN B.F., BARR Y., LEIN I., THORLAND I. 2004. Genetic variation for juvenile growth and survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 236, 167–177.
- Głowaciński Z., Makomaska-Juchiewicz M., Polczyńska-Konior G. 2002. Czerwona lista zwierząt ginących i zagrożonych w Polsce. Supplement. Oficyna Wydawnicza TEXT, Kraków, 74.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- HANSEN M.M. 2002. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology* 11, 6, 1003–1015.

- HEESE T. 2000. Certa. W: Ryby słodkowodne Polski. M. Brylińska (red.), Wydanie Nowe Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 266–272.
- HEESE T., LAMPART-KAŁUŻNIACKA M. 2002. Morfologia certy *Vimba vimba* (L., 1758), Jeziora Lubie (Górna Drawa). *Roczniki Naukowe Polskiego Związku Wędkarskiego* 15, 5–14.
- HINDAR K., RYMAN N., UTTER F. 1991. Genetic affects of aquaculture on natural fish populations. *Aquaculture* 98, 259–261.
- HLIWA P., MARTYNIAK A., KRÓL J., GANCARCZYK J. 2000. Pierwsze zarybienia certą *Vimba vimba* (L.) wód Drawieńskiego Parku Narodowego. *Komunikaty Rybackie* 6, 9–11.
- Hliwa P., Demska-Zakęś K., Martyniak A. 2002. Annual ovarian cycle of *Vimba vimba* (L.) from the Drawieński National Park in Northwest Poland. *Archives of Polish Fisheries* 10, 1, 41–50.
- HSIEH Y.W., HWANG D.F. 2004. Molecular phylogenetic relationships of puffer fish interred from partial sequences of cytochrome b gene and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (13), 4159–4165.
- HUBALKOVA Z., KRALIK P., KASALOVA, RENCOVA E. 2009. Application of DNA-based Techniques for Intraspecies Differentiation of Hake Fish. *Acta Veterinaria Brno*, 78, 673–678.
- JANKUN M. 2001. Mapa cytogenetyczna trzech gatunków ryb z rodzaju *Coregonus*: lokalizacja wybranych sekwencji DNA. Wydawnictwo UWM, Olsztyn.
- JANKUN M. 2004. Chromosomes of fishes in Poland – current state of knowledge. *Archives of Polish Fisheries* 12 (2), 223–230.
- JASKOWSKI J. 1962. Materiały do znajomości ichtiofauny Warty i jej dopływów. *Fragments Faunistica* 28, 449–499.
- JUKES T.H., CANTOR C.R. 1969. Evolution of protein molecules. W: Mammalian Protein Metabolism. H.N. Munro (red.), Academic Press, New York, 21–132.
- JURCZYK Ł., BRZUZAN P. 2004. Mitochondrial DNA study of the *Thymallus thymallus* from a southwestern region of Poland. *Archives of Polish Fisheries* 12, Supl. 2, 247–251.
- KAPUSTA A., CIESIELSKI S. 2004. Identification of cyprinid hybrids based on isozyme electrophoresis and mitochondrial DNA analysis. *Archives of Polish Fisheries* 12 (2), 209–214.
- KARTAVTSEV Y.P., LEE J.S. 2006. Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome b and cytochrome oxidase genes at the population, species, and genus levels. *Russian Journal of Genetics* 42, 4, 341–362.
- KARTAVTSEV Y.P., PARK T.J., VINNIKOV K.A., IVANKOV V.N., SHARINA S.N., LEE J.S. 2007. Cytochrome b (*Cyt-b*) gene sequence analysis in six flatfish species (Teleostei, Pleuronectidae), with phylogenetic and taxonomic insights. *Marine Biology* 152, 757–773.
- Kartner Institut für Seenforschung (KIS). 2008. Erarbeitung eines fisch ökologischen Bewertungsschemas für Österreich und Slowenien für die Umsetzung der WRRL. Bundesamt für Wasserwirtschaft, Austria.
- KEMPTER J., BARTŁOMIEJCZYK M., WIECZOREK A. 2003. Preliminary observations on the karyotype of a local form of Baltic Vimba, *Vimba vimba* (L.) from the Barycz River, Poland. International Conference „Innovation in Science and Technology”. 13–15 October 2003, Kaliningrad, USSR, 40.
- KEMPTER J., SADOWSKI J., SZEREMETA A. 2004. Preliminary studies on evaluation of chromosomal aberrations in Southern Platyfish (*Xiphophorus maculatus*), induced by genotoxic effects of malachite green. VII. Czech Ichthyological Conference. 6–7 May 2004, Vodnany, Czechy, 148–150.
- KESMINAS V., VIRBICKAS T., STAKENAS S. 1999. The state and morphological characteristics of Vimba (*Vimba vimba* L.) subpopulation in the middle Nemunas. *Acta Zoologica Lituanica* 9 (1), 147–151.
- KESZKA S., KRZYKAWSKI S. 2008. Morphometry of juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt et Ratzburg, 1833) from fish farms. *Acta Scientiarum Polonorum Piscaria* 7 (1–4), 21–36.
- KING R.C., STANSFIELD W.D., MULLIGAN P.K. 2006. A Dictionary of Genetics. Seventh edition. Oxford University Press, Oxford, 596.
- KLESZCZ M. 2004. Próba oceny liczebności stada tarłowego certy (*Vimba vimba* L.) w Baryczy. III konferencja „Karpowate ryby reofilne”, 30.06–02.07.2004, Warszawa, 5.

- KLESZCZ M., MATURA M., WITKOWSKI A. 2001. Certa, *Vimba vimba* (L.) udana próba produkcji materiału zarybieniowego i restytucji w środkowym dorzeczu Odry. *Komunikaty Rybackie* 1, 15–17.
- KLESZCZ M., WITKOWSKI A., WOLNICKI J. 2001. Certa *Vimba vimba* (L.) ze środkowego dorzecza Odry. II. Rozród, podchów wylęgu, chów narybku jesiennego w stawach. *Komunikaty Rybackie* 2, 10–12.
- KLESZCZ M., WOLNICKI J. 2002. Kontrolowany rozród certy *Vimba vimba* (L.) w dorzeczu Odry. Wylęgarnia 2001–2002. Wydawnictwo IRŚ, 63–68.
- KOHLMANN K., KEMPTER J., KERSTEN P., SADOWSKI J. 2005. Haplotype variability at the mitochondrial ND-1 gene region of *Coregonus lavaretus* from Polish lakes. *Advanced Limnology* 60, 47–57.
- KOLMAN R. 2007. Restytucja jesiotra bałtyckiego. Wydawnictwo IRŚ, Olsztyn, 53.
- KOTTELAT M. 1997. European freshwater fishes. *Biologia*, Section Zoology, 52, Supplement 5, 1–271.
- KOTTELAT M., FREYHOF J. 2007. Handbook of European freshwater fishes. Kottelat, Cornol, Switzerland and Freyhof, Berlin, Germany, 646.
- KUBOTA H., WATANABE K. 2003. Genetic diversity in wild and reared populations of the Japanese bitterling *Tanakia tanago* (Cyprinidae). *Ichthyological Research* 50, 123–128.
- LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
- LEBENKA A.Ů. 1988. Sajt – specifickésoe metilirovanie DNK osobej *Vimba vimba* L. iz otdalennyh toček areala. Materialy z koordinacionnogo cobešania predstavitelej nacionalnyh komitetom mab socialističeskich stran i 18(26) zasedaniã rabočej grupy proekta № 8^b „Vid i ego produktivnost’ v areale” sovetskogo komiteta po programme Ůnesko „Človek i biosfera”. Akademiã Nauk SSSR, Vil’ nŮs.
- LUSK S., HANEL L., LUSKOVA V. 2004. Red list of the ichthyofauna of the Czech Republic: Development and present status. *Folia Zoologica* 53, 2, 215–226.
- ŁUCZYŃSKI M. 2005. Genetyka ryb 18. Selekcja rodzinowa i wewnątrzrodzinowa (Hartl 1980). *Komunikaty Rybackie* 4, 28–30.
- ŁUCZYŃSKI M., BRZUZAN P., JANKUN M. 2003. Genetyka ryb. Wydawnictwo IRŚ, Olsztyn, 76.
- MAYDEN R. 2002. On biological species, species concepts and individuation in the natural world. *Fish and Fisheries* 3, 171–196.
- MAYR E. 1942. Systematics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York, 334.
- MAYR E. 1974. Podstawy systematyki zwierząt. Wiedza Powszechna, Warszawa, 592.
- MAYR E., ASHLOCK P. 1991. Principles of systematic zoology. Mc Graw-Hill, New York, 475.
- MILLER L.M., CLOSE T., KAPUSCINSKI R. 2004. Lower fitness of hatchery and hybrid rainbow trout compared to naturalized populations in Lake Superior tributaries. *Molecular Ecology* 13, 3379–3388.
- MINAKOWSKI W., WEIDNER S. 1998. Biochemia kręgowców. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 928.
- MOAV R., HULATA G., WOHLFARTH G. 1975. Genetic differences between the Chinese and European races of the common carp. I. Analysis of genotype environment interactions for growth rate. *Heredity* 34, 323–340.
- MYKLEBUST K.A., HEDRICK R.P. 2006. Inheritance of *Myxobolus cerebralis* Resistance among F₁-Generation Crosses of Whirling Disease Resistant and Susceptible Rainbow Trout Strains. *Journal of Aquatic Animal Health* 18, 109–115.
- NELSON J.S. 1994. Fishes of the world. John Wiley and Sons, New York, 3rd edition, 600.
- NELSON J.S. 2006. Fishes of the world. John Wiley and Sons, New York. 4th edition, 601.
- NELSON, J.S. 1999. Editorial and introduction: the species concept in fish biology. W: The species concept in fish biology. J.S. Nelson and P.J.B. Hart (red.). *Reviews of Fish Biology and Fisheries* 9 (4), 277–280.
- ODUM E.P. 1963. Podstawy ekologii. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 559.
- OPUSZYŃSKI K. 1983. Podstawy biologii ryb. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 591.

- OZER A., OZTURK T. 2005. *Dactylogyrus cornu* Linstow, 1878 (Monogenea) infections on Vimba (*Vimba vimba tenella* (Nordmann, 1840)) caught in the Sinop Region of Turkey in relation on the host factors. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29, 1119–1123.
- PANCORBO M.M., CASTRO A., FERNANDEZ-FERNANDEZ I., CUEVAS N. 2004. Cytochrome b for identification of animal species in processed food. *International Congress Series* 1261, 592–594.
- PARSON W., PEGORARO K., NIEDERSTATTER H., FOGER M. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114, 23–28.
- PATERSON H.E.H. 1985. The recognition concept of species. W: Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja. J.C. Avise (red.), 2008.
- PAYUSOVA A.N., KORESHKOVA N.D., ANDREYEVA A.P. 1976. Cytophysiological and biochemical analysis of Vimba from different regions its area. W: Vimba. Complex studies in several parts of the distribution area. R.S. Vol'skis (red.), Institute of Zoology and Parasitology, The Academy of Sciences of the Lithuanian SSR., Wilno, 145–146.
- PEPE T., TROTTA M., MARCO I.D., ANASTASIO A., BAUTISTA J.M., CORTESI M.L. 2007. Fish Species Identification in Surimi-Based Products. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 55, 3681–3685.
- PLISZKA F. 1953. Rozród i rozwój certy (*Vimba vimba* L.). *Polskie Archiwum Hydrobiologii* 1, 139–163.
- PLISZKA F. 1964. Biologia ryb. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 334.
- POVH J.A., LOPERA-BARRERO N.M., RIBEIRO R.P., LUPCHINSKI E., GOMES P.C., LOPES T.S. 2008. Genetic monitoring on fish repopulation programs using molecular markers. *Ciencia e Investigacion Agraria* 35, 1, 1–10.
- PRUSAK B., GRZYBOWSKI T. 2004. Non-random base composition in codons of mitochondria cytochrome b gene in vertebrates. *Acta biochimica polonica* 51 (4), 897–905.
- PRUSAK B., GRZYBOWSKI T., GRALAK M., GRZYBOWSKI G. 2005. Przydatność analizy sekwencji genu cytochromu b mitochondrialnego DNA do określenia pochodzenia śladów biologicznych zwierząt i ludzi. *Medycyna Weterynaryjna* 51 (2), 162–165.
- RABOVA M., RAB P., OZOUF-COSTAZ C., ENE C., WANZENBOCK J. 2003. Comparative cytogenetics and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the genus Vimba (Cyprinidae). *Genetica* 118, 83–91.
- RACZYŃSKI M., KESZKA S. 2007. Ocena aktualnego stanu i biologiczna charakterystyka populacji wędrownej formy certy (*Vimba vimba* (L.) w ujściu Odry i Zalewie Szczecińskim w obliczu restytucji gatunku. *Roczniki Naukowe Polskiego Związku Wędkarskiego* 20, 137–151.
- RACZYŃSKI M., KIRIAKA B. 2000. W poszukiwaniu ginącej certy. *Magazyn Przemysłu Rybnego* 6, 40–42.
- REPEČKA R. 1996. The biochemical composition of some selected fish species. Proceedings of the international meeting on „Baltic network of biodiversity and productivity of selected species in coastal ecosystems” 4–8 October 1995, Nida, Lithuania. R. Volskis R. (edit.), Vilnius, 53–55.
- ROŹNIATOWSKI T. 1981. Polski słownik medyczny. PZWL, Warszawa, 1431.
- RUDEK Z. 1974. Karyological investigations of two forms of *Vimba vimba* (Linnaeus 1758) occurring in Poland. *Folia Biologica* 22 (2), 212–215.
- SIMPSON G.G. 1951. The species concept. *Evolution* 5, 285–298. W: Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja. J.C. Avise (red.), 2008.
- SŁOMSKI R. 2004. Przykłady analiz DNA. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Poznań, 374.
- SOUSA V., PENHA F., COLLARES-PEREIRA M.J., CHIKHI L., COELHO M.M. 2008. Genetic structure and signature of population decrease in the critically endangered freshwater cyprinid *Chondrostoma lusitanicum*. *Conservation Genetics* 9, 791–805.
- SOVENYI J.F., BERCSENYI M., BAKOS J. 1988. Comparative examination of susceptibility of two genotypes of carp (*Cyprinus carpio* L.) to infection with *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture* 70, 301–308.
- SUZUKI R., YAMAGUCHI M. 1980. Improvement of Quality in the Common carp by Crossbreeding. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46, 12, 1427–1434.
- SYCH R. 1996. O projekcie restytucji ryb wędrownych w Polsce. *Zoologica Poloniae* 41, 47–59.

- TAJIMA F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585–595.
- TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., KUMAR S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599.
- TRAUTNER J. 2006. Rapid identification of European (*Anguilla anguilla*) and North American eel (*Anguilla rostrata*) by polymerase chain reaction. *Informationen aus der Fischereiforschung* 53, 49–51.
- TROJNICKA E., BRZUZAN P., JANKUN M., HLIWA P. 2003. Wstępne badania nad zmiennością genetyczną certy (*Vimba vimba* L.) w Polsce. *Komunikaty Rybackie* 4, 23–25.
- TROJNICKA-SZCZEPAŃSKA E. 2005. Geneza i bioróżnorodność populacji certy (*Vimba vimba* L.) dorzeczna Wisły i Odry. Rozprawa doktorska. Wydawnictwo UWM, Olsztyn, 74.
- Trzeci krajowy raport z wdrażania Konwencji o różnorodności biologicznej. 2005. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- UGURLU S., POLAT N. 2008. Fish fauna of the Karaabdal Stream (Samsun-Turkey). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 8, 121–124.
- UIBLEIN F., WINKLER H. 1994. Morphological variability among Vimba in Austria waters: quantitative examination of a taxonomic and a functional hypothesis. *Senckenbergiana biologica* 73 (1–2), 57–65.
- VOL'SKIS R. 1970. Biology and fisheries of Vimba in Europe. Institute of Zoology and Parasitology, The Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Wilno, 516.
- VOL'SKIS R.S. (red.). 1976. Vimba (Complex studies in several parts of the distribution area). Institute of Zoology and Parasitology, The Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Wilno, 236.
- WAJDOWICZ Z. 1967. Jeszcze o cercie. *Gospodarka Rybna* 1, 7.
- WAJDOWICZ Z. 1971. Pierwsza produkcja jesiennego narybku „rybca”. *Gospodarka Rybna* 1, 7.
- WATANABE K., KANAGAWA N., KAKIOKA R., ITAI T., MORI S. 2009. Genetic diversity and conservation units in wild and captive populations of endangered freshwater fishes: a case of *Hemigrammocypris rasborella* in Shizuoka, Japan. *Ichthyological Research* 56, 411–416.
- Wiśniewolski W. 2007. Certa – występowanie, znaczenie, zarys restytucji. *Komunikaty Rybackie* 1, 10–15.
- WIŚNIEWOLSKI W., AUGUSTYN L., BARTEL R., DEPOWSKI R., DĘBOWSKI P., KLICH M., KOLMAN R., WITKOWSKI A. 2004. Restytucja ryb wędrownych a drożność polskich rzek. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Śródlądowego, Warszawa.
- WITKOWSKI A., BARTEL R., KLESZCZ M. 2001. Udane restytucje ryb w Polsce. *Roczniki Nauk Polskiego Związku Wędkarskiego* 14 (supl.), 83–90.
- WITKOWSKI A., BARTEL R., KOLMAN R., WIŚNIEWOLSKI W. 2004. The realization of a program for restituting migratory fishes in the Vistula and Oder River systems. *Archives of Polish Fisheries* 12 (2), 309–325.
- WITKOWSKI A., KLESZCZ M., HEESE T., MARTYNIAK A., 2004. Vimba *Vimba vimba* (L.) of the Oder River system: history, current status and perspectives. *Archives of Polish Fisheries* 12 (2), 103–115.
- WITKOWSKI A., KOTUSZ J., PRZYBYLSKI M. 2009. Stopień zagrożenia słodkowodnej ichtiofauny Polski: Czerwona lista minogów i ryb – stan 2009. *Chrońmy Przyrodę Ojczystą* 65, 1, 33–52.
- WOLFRAM G., MIKSCHI E. 2001. Rote Liste der Fische (Pisces) Österreichs. W: Tiere Österreichs. Umweltbundesamt-Monographien. Band 15, Wien.
- World Conservation Union. East European programme. Environmental Status Reports: 1993. Estonia, Latvia, Lithuania. R. Ernsteins (red.), 5, 127.
- WYSUJACK K., GREENBERG L.A., BERGMAN E., OLSSON I.C. 2009. The role of the environment in partial migration: food availability affects the adoption of a migratory tactic in brown trout *Salmo trutta*. *Ecology of Freshwater Fish* 18, 52–59.

Źródła internetowe

<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>

<http://www.citeulike.org/user/echinotrix/article/691774>

<http://www.fishbol.org/>

<http://www.iucnredlist.org>. Crivelli, A.J. 2006. *Vimba melanops*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.3. Downloaded on 19 October 2010

<http://www.raudonojiknyga.lt/index.php>

Summary

Genetic variability of selected populations of vimba, *Vimba vimba* (L.), based on molecular analysis of the cytochrome B gene – in relation to preservation of the species

Studies on genetic purity have been considered a fundamental aspect of natural protection, as highlighted in the Convention on Biological Diversity. Faced with a requirement to comply with the relevant regulations, Poland needs to carry out studies on the genetic characteristics of individual species of animals and plants, in particular those which are endangered. One such species is vimba, listed in the „Polish Red Book of Animals” volume 1, vertebrates, and on the „Red List of Threatened Species”. As a result, action must be taken to protect this fish and increase its numbers. Such tasks are feasible only when the species is well characterised in its biometrics/morphology as well as in its genetics. Unfortunately, information on the European vimba is somewhat scarce. Therefore, the current study focused on:

1. Determining and characterizing haplotypes in selected populations, through restriction analysis,
2. Assessing the divergence between individual populations, based on the sequence analysis of a cytochrome B gene fragment,
3. Selecting cytochrome B gene fragments suitable in designing primers for distinguishing different vimba populations,
4. Determining the extent of biodiversity of the studied vimba populations in relation to their suitability as prospective broodstock (and a „live gene bank”),
5. Selecting natural populations capable of providing broodfish for creating genetically stable broodstock.

In total, the genetic analysis in the study was based on DNA isolated from 137 individuals of *Vimba vimba*, collected from 16 sampling sites, representing eight European countries. The methods used involved the restriction analysis and sequencing of the acquired restrictive patterns. The study yielded 5 haplotypes within 15 populations. Taking into account a negative score on the Tajima test, I concluded that the Polish populations of vimba are at the stage of genetic retrogression. This is probably due to the fact that fish stocking based on „local stocks” has been inefficient. Bearing in mind the diversity level of vimba from the Kolpa and Danube rivers and Lake Traunsee, I recommend crossing these populations with those in Poland (the Noteć River vimba and the „remaining” vimba of haplotype one) to obtain genetically stable stocking material. The broodstock obtained in such a way may constitute a promising alternative to the action already undertaken to protect *Vimba vimba*.

Zusammenfassung

Genetische Veränderlichkeit von gewählten Populationen der Zärte *Vimba vimba* (L.) auf Grundlage der molekularen Analyse des Cytochrom b - Gens vom Standpunkt des Artenschutzes aus

Untersuchungen über die Artenreinheit sind grundlegender Bestandteil des Umweltschutzes, wovon auch im Übereinkommen über die biologische Vielfalt die Rede ist. Um die auf Polen auferlegten Verpflichtungen zu erfüllen ist es erforderlich Untersuchungen zu führen, die genetische Charakteristik der einzelnen Pflanzen- und Tierarten und insbesondere der bedrohten Arten erlauben. Zu solchen Arten gehört die Zärte, die in das polnische Rote Buch der Tiere, Band I – Wirbeltiere, und in die sog. Rote Liste der aussterbenden und bedrohten Tiere aufgenommen wurde. Dies bedeutet, dass aktive Formen zu ihrem Schutz und zur Stärkung ihrer Population einzuleiten sind. Die Realisierung dieser Aufgabe ist nur dann möglich, wenn die gegebene Art sowohl biometrisch-morphologisch als auch genetisch charakterisiert ist.

Weil es sehr wenige Informationen über europäische *Vimba* Populationen gibt, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Themen bearbeitet:

1. Charakteristik und Beschreibung der Haplotypen von ausgewählten *Vimba* Populationen mit Hilfe der Restriktion Analyse,
2. Bewertung der Divergenz zwischen einzelnen Populationen auf Grund der Analyse des Cytochrom b – Gens Fragment,
3. Nachweis von Cytochrom b – Gen Fragmenten die für die Populationsdifferenzierung nutzbar sind,
4. Feststellung der biologischen Variabilität der analysierten *Vimba* Populationen im Hinblick auf die für die Zucht bestimmten Fische zur Bildung einer Gen Bank.
5. Markierung von Populationen die eine potenzielle Quelle für einen Laichfischbestand einer genetisch, stabilen Fischgruppe bilden.

Für die genetische Analyse nutzte man DNA, die aus 137 *Vimba vimba* – Individuen ausisoliert wurden, die aus 16 Fangstellen in acht europäischen Ländern stammten. Als Forschungsmittel wurden die Restriktionsanalyse als auch das Sequenzieren von gewonnenen Restriktionsformeln eingesetzt. Dies ermöglichte die Aufstellung von fünf Haplotypen in der Gruppe von 15 analysierten Populationen. Auf Grundlage des negativen Wertes von Tajima's Test wurde festgestellt, dass sich die untersuchten polnischen Populationen der Zärte in der genetischen Regression befinden. Wahrscheinlich aus diesem Grund waren die bisherigen, auf "lokalen Schwärmen" basierenden Jungfischeinsätze, wenig erfolgreich. Unter Beachtung des Differenzierungsniveaus der Zärten aus den Flüssen Kolpa und Donau und aus dem Traunsee wurde vorgeschlagen, eine Probe der Kreuzung der o.g. Populationen mit den polnischen Populationen (die Noteć-Zärte und "sonstige" Population, die den ersten Haplotyp vertritt) vorzunehmen, um ein genetisch stabiles Material für Jungfischeinsätze zu gewinnen. Der in dieser Weise gewonnene genetisch stabile Laicherbestand kann eine Alternative zu den Maß-

nahmen im Zusammenhang mit dem aktiven Schutz der *Vimba vimba* – Art darstellen und nicht wie bisher nur ihrer lokalen Populationen.