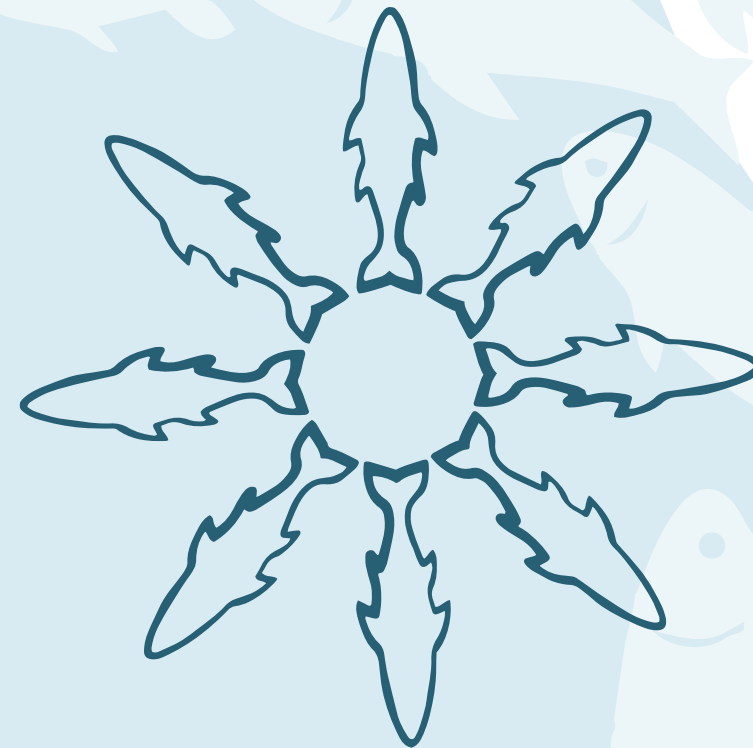


51. SZKOLENIE KONFERENCJA HODOWCÓW RYB ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

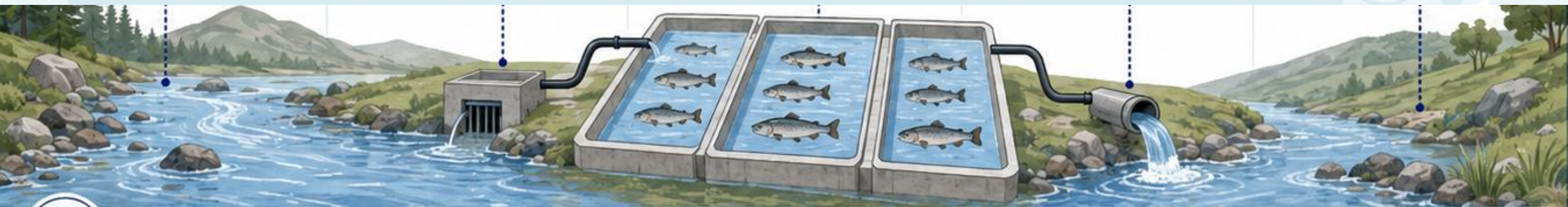


Molekularny monitoring wody z wykorzystaniem eDNA

Diagnostyka chorób i zarządzanie hodowlą ryb

Radosław Kowalski, Maksymilian Krzyś, Karol Cieleń,
Beata Sarosiek, Michał Blitek

InLife IRZiBŻ PAN, PZW Nowy Sącz, PZW Wrocław



51 SZKOLENIE
KONFERENCJA
HODOWCÓW RYB
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Woda jako próbka biologiczna

eDNA

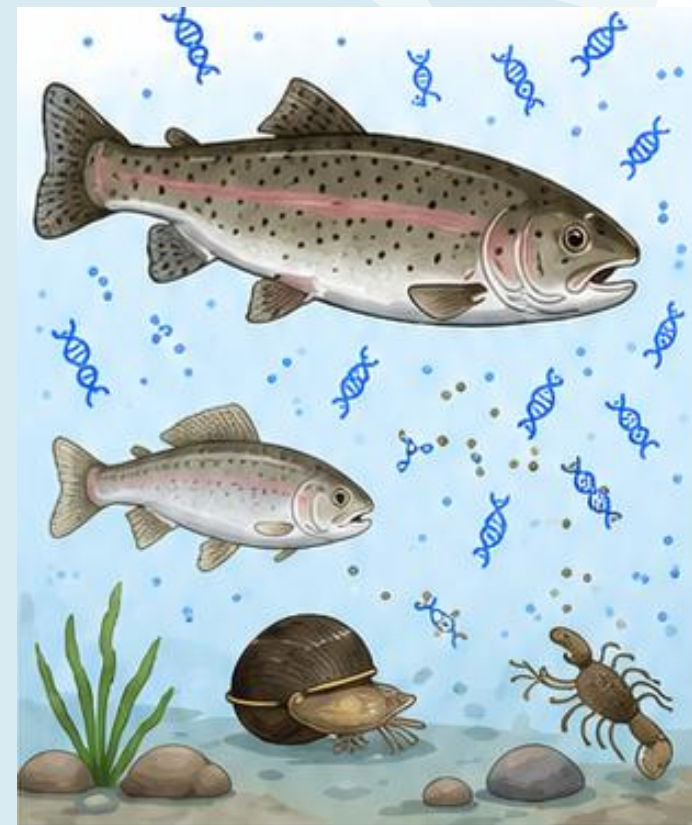
DNA obecne w środowisku, m.in. w komórkach, śluzie, odchodach, gametach i fragmentach tkanek.

eRNA

RNA środowiskowe. Obejmuje także materiał wirusów RNA oraz wybrane transkrypty organizmów.

Pobór bez odłowu

Stałe punkty i powtarzane terminy pozwalają obserwować zmiany w czasie.



Jak pobrać eDNA ryb z wody?

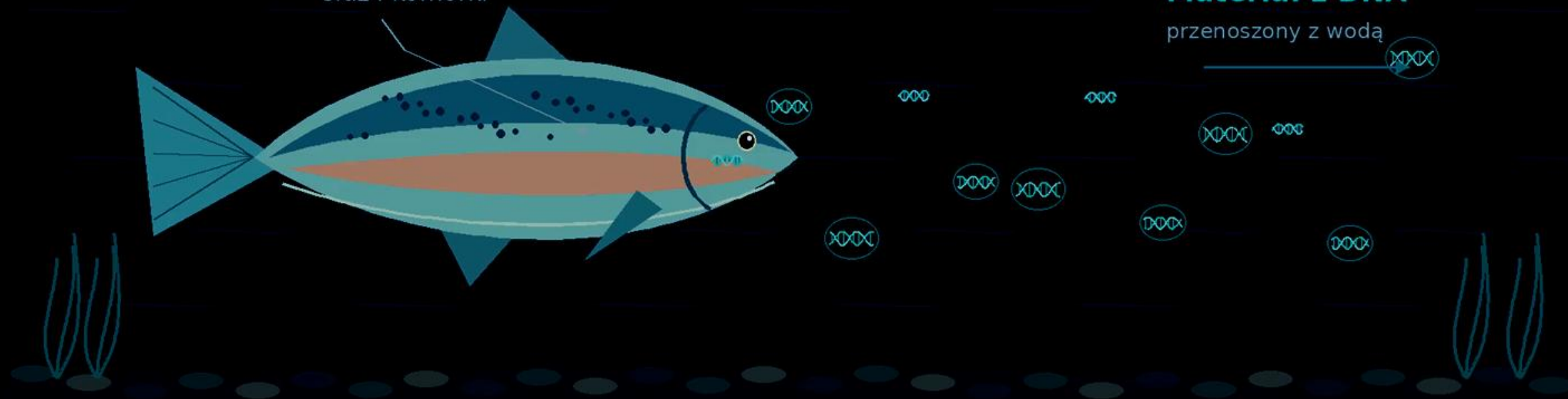
1 Ślad w wodzie

2 Pobór próbki

3 Filtracja

4 Analiza

RYBA POZOSTAWIA ŚLAD śluz i komórki



Ryby uwalniają DNA do środowiska.

Śluz, komórki i odchody dostarczają materiału genetycznego do wody.

SCHEMAT EDUKACYJNY • NIE W SKALI

POBÓR WODY → ANALIZA MOLEKULARNA

eRNA z ikry podczas tarła

1 Tarło i ikra

2 Pobór przy ikrze

3 Ochrona RNA

4 Analiza



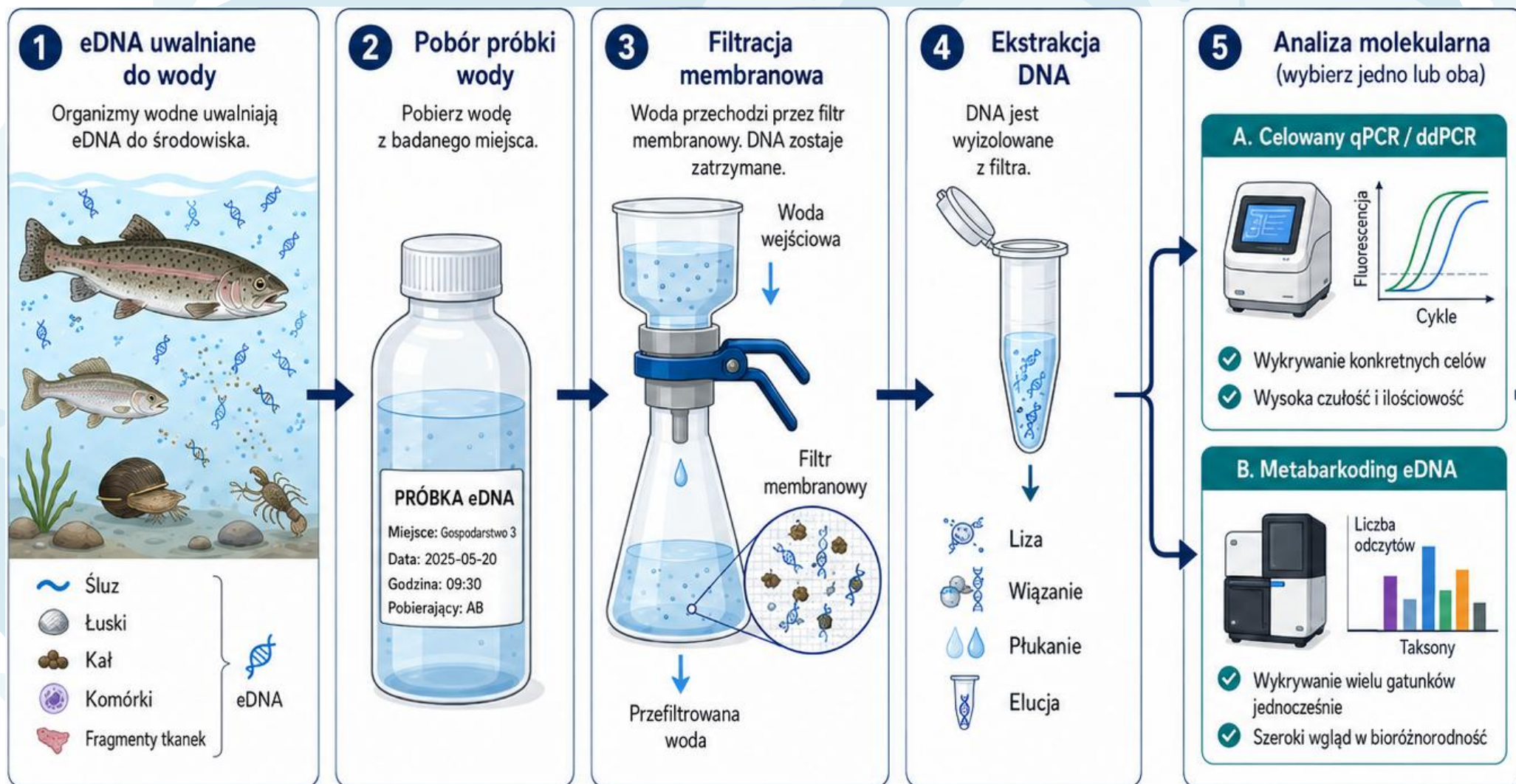
Pobieramy wodę w miejscu tarła.

Schemat koncepcyjny: udział ikry w sygnale eRNA trzeba potwierdzić.

SCHEMAT EDUKACYJNY • NIE W SKALI

POBÓR WODY → ANALIZA MOLEKULARNA

Od poboru do analizy molekularnej



Pytanie badawcze decyduje o metodzie

Metoda	Główne pytanie	Wynik
qPCR / ddPCR	Czy występuje konkretny gatunek lub patogen?	Detekcja celu i oszacowanie ilości jego DNA
RT-qPCR	Czy w próbce jest określony RNA?	Detekcja wirusa RNA lub wybranego transkryptu
Metabarkoding	Jakie taksony wykrywamy w próbce?	Profil składu zespołu na podstawie sekwencji

Dobór starterów, markerów i kontroli określa zakres odpowiedzi.



51 SZKOLENIE
KONFERENCJA
HODOWCÓW RYB
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



04

qPCR / ddPCR

Jak wykryć i zmierzyć wybrane DNA?

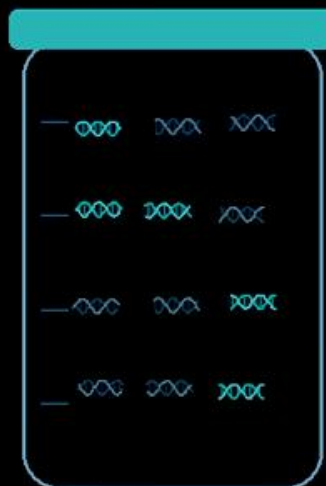
1 Wybór celu

2 qPCR: światło

3 ddPCR: krople

4 Wynik

MIESZANINA DNA



wybieramy cel testu



DNA pstrąga

przykładowy cel

materiał z próbki wody

Najpierw wybieramy, jakiego DNA szukamy.

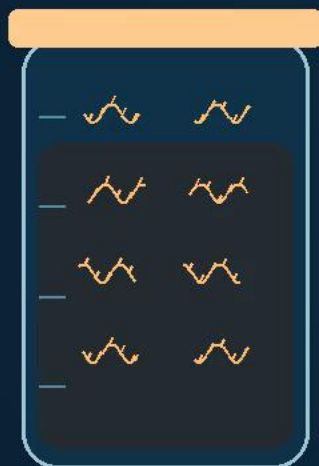
Test jest nastawiony na konkretny fragment — np. DNA wybranego gatunku ryby.

RT-qPCR

Jak zmierzyć RNA za pomocą DNA?

1 RNA w próbce — 2 Kopia DNA — 3 Kopiowanie i pomiar — 4 Wynik

RNA W PRÓBCE



RNA

wybrany fragment do pomiaru

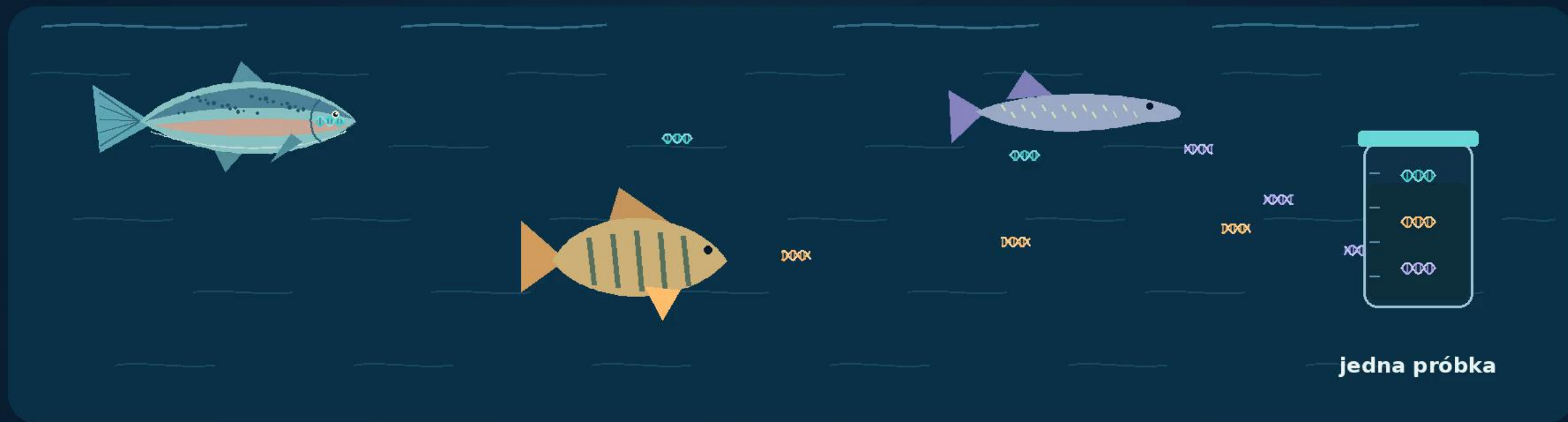
RT-qPCR zaczyna się od RNA.

Wybieramy fragment RNA, którego obecność i ilość chcemy zbadać.

Metabarkoding

Jak rozpoznać wiele gatunków naraz?

- 1 Mieszanina DNA
- 2 Kopiowanie kodów
- 3 Odczyt liter
- 4 Katalog gatunków



W jednej próbce jest mieszanka DNA różnych gatunków.

Metabarkoding pozwala szukać wielu gatunków jednocześnie.

Pobór i zabezpieczenie próbki

Objętość i filtr

Od kilkuset mililitrów do kilku litrów, zależnie od matrycy i celu. Porowatość i materiał filtra wymagają walidacji.

Konserwacja

Szybkie zabezpieczenie filtra według protokołu laboratorium. Przy eRNA szczególnie ważna jest kontrola czasu.

Identyfikowalność

Punkt, data, godzina, objętość, warunki poboru i sposób transportu muszą towarzyszyć każdej próbce.



Kontrole jakości na każdym etapie

Etap	Kontrola	Co sprawdzamy
Teren i filtracja	Próby ślepe	Zanieczyszczenie przy poborze i obróbce
Ekstrakcja	Kontrole ujemne i odzysku	Czystość procesu i skuteczność izolacji
Reakcja PCR	Kontrola dodatnia, bez matrycy i inhibicji	Działanie testu, kontaminację i inhibitory
Interpretacja	Powtórzenia i reguły detekcji	Powtarzalność oraz wyniki blisko granicy wykrywalności

Raport powinien podawać granicę wykrywalności i zasady kwalifikowania wyniku.



51 SZKOLENIE
KONFERENCJA
HODOWCÓW RYB
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



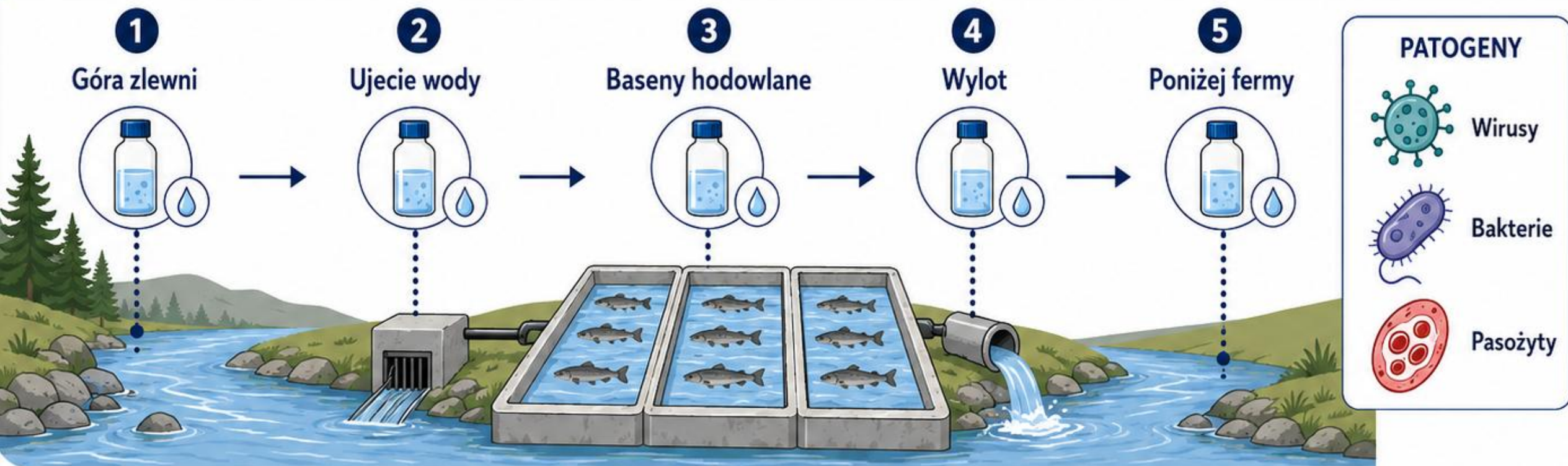
Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



06

Układ punktów w gospodarstwie



Porównanie ujęcia, obiektu i odbiornika pomaga ocenić, gdzie pojawia się lub nasila sygnał.

Patogeny: sygnał ostrzegawczy w wodzie

12 tygodni

monitoringu w dwóch RAS
z łososiem atlantyckim

Dla SGPV (Salmon gill poxvirus) i ISAV-
HPR0 (wirus zakaźnej anemii łososia)
sygnał w wodzie odzwierciedlał
dynamikę zakażenia.

Zależność była słabsza lub nieobecna
dla innych badanych patogenów.



**Czas wyprzedzenia wymaga walidacji
dla patogenu i systemu hodowlanego.**



**51. KONFERENCJA
SZKOLENIE
ŁOSOSIOWATYCH**

Krishna WSP. - 2026 Wskaźnik ostrzegawczy jest poglądowy.



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



08

SGPV i ISAV-HPRO

Dwa różne wirusy. Dwa rodzaje materiału genetycznego.

SGPV

Wirus ospy skrzeli łososia



Może uszkadzać skrzela
i wywoływać chorobę.

ISAV-HPRO

Wariant wirusa zakaźnej anemii łososia



Zwykle przejściowe zakażenie
bez typowej choroby ISA.

Wykrycie DNA / RNA nie dowodzi obecności zakaźnych cząstek.

SGPV: wirus ospy skrzeli łososia

- 1 Budowa wirusa
- 2 Skrzela ryby
- 3 Próbką wody
- 4 Sygnał w czasie

Salmon gill poxvirus



Umowny przekrój cząstki wirusa

Wirus DNA

Rodzina Poxviridae

DNA dwuniciowe

Materiał genetyczny ma dwie nici.

Zakaża komórki skrzeli łososia.

Może prowadzić do ich uszkodzenia.

SGPV to wirus ospy skrzeli łososia.

Jego materiałem genetycznym jest DNA; głównym miejscem zakażenia są skrzela.

ISAV-HPRO: co oznacza ten wariant?

- 1 Budowa wirusa
- 2 Skrzela ryby
- 3 Próbkę wody
- 4 Sygnał w czasie

Infectious salmon anaemia virus



Umowny przekrój cząstki wirusa

Wirus RNA w osłonce

Rodzina Orthomyxoviridae

8 segmentów RNA

Każdy segment to pojedyncza nić.

HPRO = wariant ISAV

Region HPR białka HE jest pełny,
bez charakterystycznej delecji.

ISAV-HPRO to wariant wirusa zakaźnej anemii łososia.

HPRO opisuje cechę jego genomu — nie oznacza braku wirusa.

Interpretacja wzrostu sygnału

Gdzie rośnie sygnał?	Możliwe wyjaśnienie	Dalsza weryfikacja
Przed ujęciem	Dopływ materiału ze zlewni	Powtórny pobór i ocena sytuacji powyżej obiektu
W sektorze produkcji	Źródło w obiekcie lub uwalnianie przez obsadę	Badanie ryb i przegląd zdarzeń technologicznych
W wielu punktach po ulewie	Zmiana transportu lub rozcieńczenia materiału	Przepływ, opady i próbka po ustabilizowaniu warunków

To hipotezy interpretacyjne. Dodatni wynik wymaga kontekstu.



51 SZKOLENIE
KONFERENCJA
HODOWCÓW RYB
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



09

Wynik dodatni i brak detekcji

Wynik dodatni

W próbce wykryto materiał genetyczny celu.

Interpretacja obejmuje kontrole, źródło sygnału i możliwy transport z wodą.

Żywotność patogenu i choroba ryb wymagają odrębnego potwierdzenia.

Brak detekcji

Sygnał może być poniżej granicy wykrywalności.

Możliwe przyczyny to mała ilość DNA, inhibicja lub niedopasowany pobór.

Seria powtórzeń daje silniejszą podstawę oceny niż pojedyncza próbka.



Molekularna mapa rzeki



Metabarkoding opisuje zmiany składu ichtiofauny między odcinkami i kolejnymi terminami.

Wynik zależy od transportu DNA, pory roku, starterów i bazy referencyjnej.



51. KONFERENCJA
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
Dla Rybackstwa



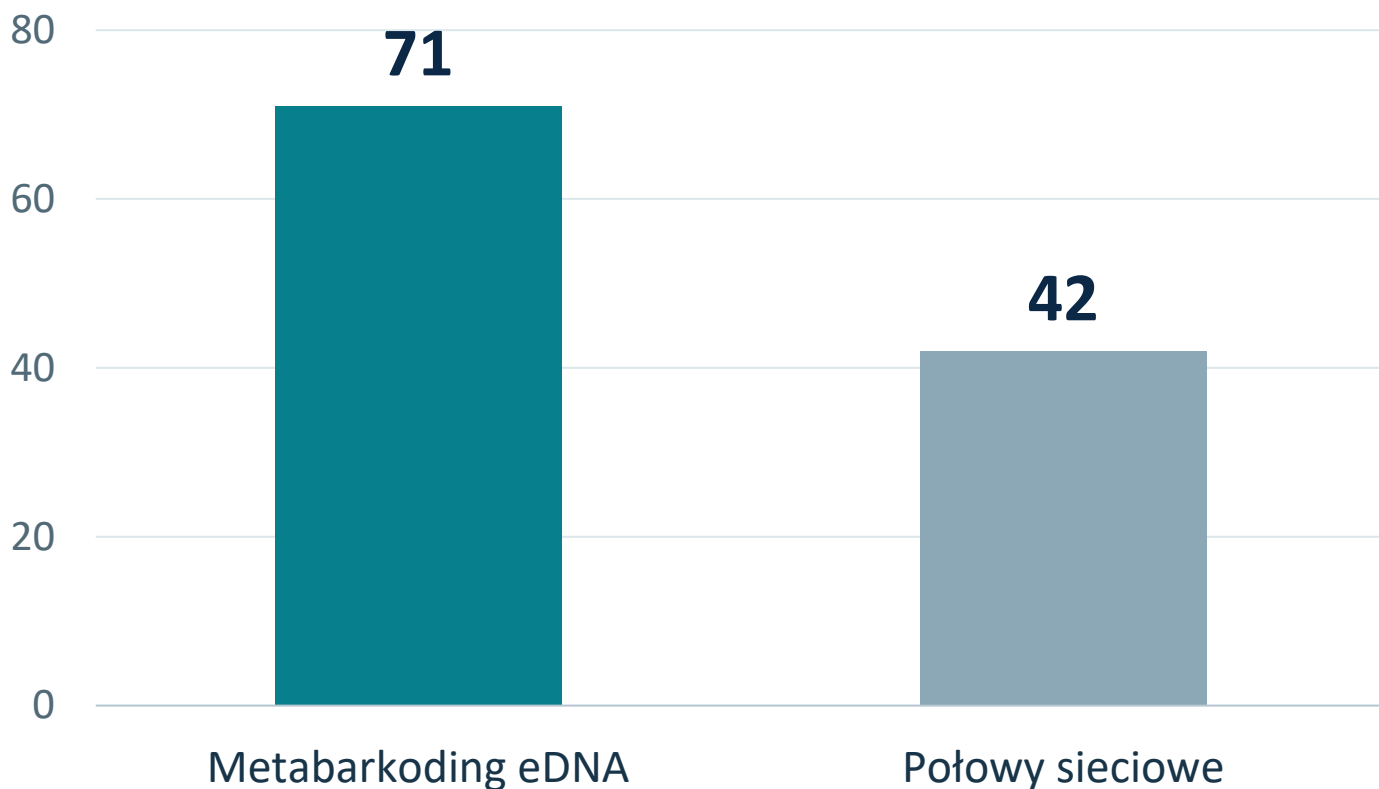
Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Przykład: ichtiofauna estuarium Skaldy

Liczba gatunków ryb



Ten sam okres badań

Obie metody porównywano w jednym estuarium.

Dodatkowa informacja

eDNA odzwierciedlało również zmiany sezonowe i przestrzenne.

Wczesne wykrywanie gatunków obcych

Niska liczebność utrudnia klasyczne wykrycie

Celowany test może wskazać odcinek wymagający dokładniejszego rozpoznania.

Potwierdzenie sygnału

Powtórny pobór, kontrole i odpowiednio zwalidowany test.

Ustalenie zasięgu

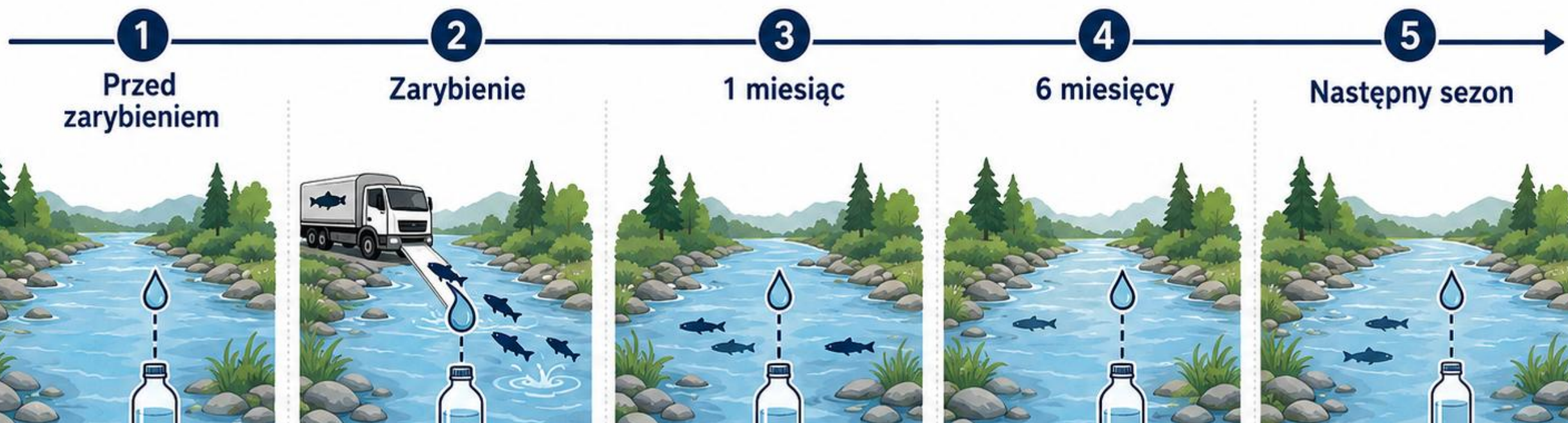
Zagęszczenie stanowisk i wykorzystanie metod klasycznych.

Przykład zastosowania

eDNA i hydroakustyka w monitoringu suma w Hiszpanii.



Ocena skuteczności zarybień



Pomiar bazowy i seria po zarybieniu pokazują pojawienie się, zasięg i trwałość sygnału gatunku.

Utrzymujący się sygnał wymaga potwierdzenia przeżycia i rekrutacji.

Kalibracja sygnału do liczebności

Równoległy pomiar

eDNA i elektroodłów, hydroakustyka lub liczenie tarlaków na tym samym odcinku i w zbliżonym czasie.

Różne warunki

Powtórzenia przy różnych przepływach, temperaturach i fazach cyklu biologicznego.

Lokalny model

Najpierw ocena trendu i wykrywalności. Przeliczanie na liczebność dopiero po walidacji modelu.



Pochodzenie ryb i naturalna rekrutacja

Narzędzie	Jaką informację daje?	Czego potrzebujemy?
Standardowe eDNA gatunkowe	Wykrycie gatunku i jego sygnału w czasie	Porównywalnych próbek środowiskowych
PBT (Parentage-Based Tagging) i markery pochodzenia	Przypisanie osobnika do rodziców lub grupy pochodzenia	Genotypów referencyjnych i zwykle próbki tkanki
Ocena rekrutacji	Dowody obecności nowego pokolenia	Odłowu młodych i danych biologicznych lub genetycznych

Pochodzenie osobników z mieszaniny eDNA pozostaje trudnym zadaniem.



51. SZKOLENIE
KONFERENCJA
HODOWCÓW RYB
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Rozród: co wnosi eRNA?

klhl10

Marker związany z jądrami

Wzrost liczby transkryptów w wodzie wiązał się z zachowaniami rozrodczymi medaki.

Krótką trwałość sygnału

Dla innego markera, muc5ac, okres półtrwania wynosił około 15 minut w 25°C.

Potencjał i ograniczenie

Wykrywanie aktywności rozrodczej wymaga walidacji markerów dla gatunku i warunków terenowych.



51 SZKOLENIE
KONFERENCJA
2025. Badanie
modelowe na medace, Oryzias
LOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Restytucja wymaga potwierdzenia rekrutacji

Etap biologiczny	Sygnał molekularny	Potwierdzenie terenowe
Obecność dorosłych	Detekcja gatunku w rejonie potencjalnych tarlisk	Obserwacja ryb i wykorzystania siedlisk
Okres tarła	Przestrzenne i sezonowe piki eDNA, docelowo eRNA	Gniazda, zachowania tarłowe, dojrzałe ryby
Nowe pokolenie	Sygnał gatunku po inkubacji i wylęgu	Narybek, wiek i pochodzenie osobników

Powtarzanie oceny w kolejnych latach pozwala śledzić trwałość odtwarzania populacji.



51 SZKOLENIE
KONFERENCJA
HODOWCÓW RYB
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Rzeka i jezioro: różna strategia poboru

Rzeka

Stanowiska wzdłuż cieku, powyżej i poniżej źródeł sygnału. Kluczowe są przepływ i transport materiału.

Jezioro

Stanowiska obejmujące strefy przybrzeżne, otwartą wodę i różne głębokości. Znaczenie ma mieszanie wód.



W obu siedliskach próbki trzeba szybko i właściwie zabezpieczyć.

Kontekst środowiskowy i technologiczny

Hydrologia

Przepływ, opady, wezbrania i mętność wpływają na transport oraz rozcieńczenie materiału.

Warunki i obsada

Temperatura, tlen, zagęszczenie ryb, karmienie i tarło pomagają wyjaśnić zmienność sygnału.

Zabiegi w gospodarstwie

Leczenie, dezynfekcja, kąpiele, sortowanie i transfery wymagają wpisu do dokumentacji poboru.



51 SZKOLENIE
KONFERENCJA
HODOWCÓW RYB
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Pilotaż w gospodarstwie

$$5 \times 6 = 30$$

punktów × terminów
= próbek podstawowych

**Powtórzenia terenowe i kontrole
zwiększają liczbę analiz.**

Zakres

Jeden cel lub krótki panel dobrany do potrzeb gospodarstwa.

Regularność

Przykładowo co 2–4 tygodnie w okresie zwiększonego ryzyka.

Pierwszy sezon

Porównanie z obserwacjami i diagnostyką. Dopiero potem lokalne progi działania.



51 SZKOLENIE
KONFERENCJA
HODOWCÓW RYB
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Koszt analizy jednej próbki

Rodzaj analizy	Przykłady cen źródłowych	Okolo PLN / próbkę
qPCR: 1 cel	55 USD lub 99 EUR	205–427 zł
qPCR: 3 cele	145 USD lub 131 EUR	539–565 zł
Metabarkoding ryb	115 USD lub 320 EUR	428–1379 zł
Panel 6 markerów	7500 USD / 30 próbek	930 zł

Budżet przykładowego pilotażu

30 próbek podstawowych w jednym sezonie

Zakres	Koszt analiz 30 próbek
qPCR: 1 cel	6,1–12,8 tys. zł
qPCR: 3 cele	16,2–16,9 tys. zł
Metabarkoding ryb	12,8–41,4 tys. zł

Osobno: pobór i transport, powtórzenia terenowe, dodatkowe kontrole,
VAT oraz ewentualne opracowanie lub walidacja testu.



51. SZKOLENIE
KONFERENCJA
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską





Dziękuję za uwagę



51 SZKOLENIE
KONFERENCJA
HODOWCÓW RYB
ŁOSOSIOWATYCH



Fundusze Europejskie
dla Rybactwa



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską

