

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

1. Tytuł projektu: Analiza procesu eliminacji genomu w gametogenezie hybrydogenetycznych mieszańców żab zielonych *Pelophylax esculentus* complex

Czas trwania projektu 01.06.2016 - 30.10.2018

2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): żaba wodna/*Pelophylax esculentus*, hybrydogeneza, eliminacja genomu, porównawcza hybrydyzacja genomowa, rozwój gonad

3. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) - A

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Żaba wodna *Pelophylax esculentus* (RL) jest mieszańcem międzygatunkowym, który posiada genom gatunków rodzicielskich *Pelophylax ridibundus* (RR) i *Pelophylax lessonae* (LL). Żaby wodne są zdolne do reprodukcji dzięki zjawisku hybrydogenezy, polegającej na eliminacji jednego z genomów gatunków rodzicielskich z komórek linii płciowej mieszańca i przekazaniu do gamet genomu drugiego z gatunków.

Celem projektu jest opis i wyjaśnienie na poziomie komórkowym, tkankowym i molekularnym mechanizmu eliminacji genomu u mieszańców o genotypach diploidalnych RL oraz triploidalnych RLL

i RRL. U kijanek i osobników juvenilnych planujemy pobranie gonad do badań cytologicznych i molekularnych, które mają wyjaśnić przebieg procesu tworzenia i degradacji mikrojąder, jako przypuszczalnego nośnika eliminowanego genomu.

Osobniki dorosłe do badań zostaną odłowione ze stabilnych, licznych populacji (wieloletni monitoring), co nie spowoduje dla nich zagrożenia. Kijanki o określonych genotypach uzyskamy w wyniku sztucznego zapłodnienia osobników gatunków rodzicielskich i mieszańców. Samice będą pobudzane do owulacji jaj przez podanie hormonu gonadotropowego. U części samców mieszańcowych będzie pobierane operacyjnie jedno jądro do zapłodnienia, a po wybudzeniu samiec będzie hodowany przez 2-3 tygodnie. Od osobników dorosłych oraz od kijanek pobrane zostaną tkanki do badań chromosomowych, histologicznych i molekularnych (uśmiercenie osobników).

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

Badania będą przeprowadzone na gatunkach: Żaba wodna *Pelophylax esculentus*, Żaba śmieszka *Pelophylax ridibundus*, Żaba jeziorkowa *Pelophylax lessonae*. Wśród wszystkich dostępnych zwierząt laboratoryjnych nie ma gatunków o tak unikatowym procesie gametogenezy i sposobie reprodukcji (hybrydogeneza). Nie ma zatem możliwości prowadzenia badań na innych gatunkach jak występujące w Polsce żaby zielone.

W celu zapewnienia powtarzalności metod badawczych i liczebności grup do analizy statystycznej należy wykonać co najmniej 28 krzyżówek, w których zostanie użytych 28 osobników rodzicielskich, poddanych procedurom. Aby zrealizować założenia projektu, krzyżowaniu należy poddać mieszańce diploidalne o genotypie RL oraz triploidalne o genotypie LLR, oraz osobniki czystych gatunków. Dodatkowo należy przeprowadzić badania skuteczności usuwania genomu na 30 osobnikach juvenilnych i dorosłych. Liczebność osobników juvenilnych jest uzasadniona brakiem możliwości rozpoznania płci na podstawie cech zewnętrznych, więc aby uzyskać statystycznie istotny wynik i pozyskać około 10 samców należy dokonać preparacji 20 osobników. W przypadku samców 10 osobników będzie stanowiło reprezentatywną grupę badawczą. W przypadku osobników larwalnych do uzyskania grup statystycznych należy pozyskać 360 osobników (30 os. żaby śmieszki, 30 os. żaby jeziorkowej, 300 os. żaby wodnej). Liczba krzyżówek i pobieranych do badań osobników dorosłych oraz larwalnych jest również uzasadniona z powodu dużej śmiertelności i wad rozwojowych (esculenta syndrom), obserwowanych u potomstwa mieszańcowego, co może wykluczyć część pozyskanego materiału z dalszych analiz.

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA¹

Na podstawie przeszukania istniejącej literatury stwierdzam, że zastosowane metody, w tym uzyskiwanie potomstwa w wyniku sztucznego krzyżowania, są standardowymi metodami wykorzystywanymi w badaniach dotyczących gametogenezy. Wykonywane czynności nie powodują dodatkowego dyskomfortu ani dystresu. W literaturze nie ma podanych alternatywnych metod do uzyskania założonego celu badawczego. Wszystkie wykorzystywane procedury wykonywane są z należytą dokładnością i poszanowaniem dla życia i samopoczucia badanych zwierząt.

Uwzględnienie zasady zastąpienia:

Wśród wszystkich dostępnych zwierząt laboratoryjnych nie ma gatunków o tak unikatowym procesie gametogenezy i sposobie reprodukcji (hybrydogeneza). Nie ma zatem możliwości prowadzenia badań na innych fizjologicznym modelu. Wyjaśnienie zjawiska eliminacji jednego genomów u mieszańca w trakcie powstawania komórek płciowych pozwoli zrozumieć unikatowe mechanizmy regulacji mejozy i odstępstwa od reguły w tym konserwatywnym procesie.

Uwzględnienie zasady ograniczenia:

Liczba zwierząt wykorzystywanych w doświadczeniu została ograniczona do poziomu niezbędnego do osiągnięcia celów projektu i uzyskania powtarzalnych danych wiarygodnych statystycznie. Kontrolowane krzyżowanie osobników żab zielonych pozwoli uzyskać w pierwszym pokoleniu potomstwo o określonym genomie i podobnych cechach morfologicznych, w tym hybrydy pochodzące bezpośrednio od gatunków rodzicielskich. Takie potomstwo charakteryzuje się większą przeżywalnością i ma mniej nagromadzonych letalnych mutacji (wynik hemiklonalnego przekazywania genomu) w porównaniu do osobników larwalnych pozyskiwanych z naturalnego środowiska. Jednorodność potomstwa zwiększy powtarzalność wyników i tym samym pozwoli na wykorzystanie mniejszej liczby zwierząt.

Uwzględnienie zasady udoskonalenia:

Wykorzystywane do badań zwierzęta będą utrzymywane w warunkach odpowiednich dla ich gatunku jak i stadium rozwojowego. Wszelkie zastosowane procedury charakteryzują się niską inwazyjnością. Pobieranie tkanek odbywać się będzie po uprzedniej premedykacji (roztworem MS 222) i późniejszym bezbolesnym uśmierceniu. Wszystkie przeprowadzane procedury będą przeprowadzane z maksymalnym ograniczeniem bólu, strachu i dystresu.

¹ Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8