

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 13

Issue 2

Gödöllő
2017

MITOKONDRIÁLIS GENETIKAI VIZSGÁLAT A VELENCEI-TAVI VADPONTY ANYAJELÖLTJEINEK ÁLLOMÁNYÁN

Keszte Szilvia¹, Stein Renáta¹, Kánainé Sipos Dóra¹, Balogh Erna¹, Zellei Ágnes², Sebestyén András², Balogh Réka¹, Gutti Csaba Ferenc¹, Bokor Zoltán¹, Urbányi Béla¹, Kovács Balázs¹

¹Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék, Gödöllő

²Magyar Országos Horgász Szövetség, Budapest
Szilvia.Keszte@phd.uni-szie.hu

Received – Érkezett: 25. 11. 2017.
Accepted – Elfogadva: 02.07. 2018.

Összefoglalás

Munkánk során a Velencei-tavi vadponty (*Cyprinus carpio carpio* morpha *hungaricus*) állomány anyajelöltjeinek mitokondriális DNS szekvenciáját vizsgáltuk. Célunk az állomány diverzitásának felmérése és keresztezési terv kidolgozása egy tenyészállomány létrehozásához. A vizsgálat során 150 mintából 135 egyed mitokondriális DNS-ének kontroll (D-loop) régióját vizsgáltuk meg, mely alapján 19 (haplotípust hordozó) anyai vonalba tudtuk besorolni az egyedeket. A leggyakoribb haplotípusba (Hap_3) 94 egyed, a legritkább haplotípusokba (Hap_4, 6 és 19) 1-1 egyed tartozik. Az egyes genotípusok előfordulási gyakorisága alapján 16 haplotípus (Hap_2, 4-7 és 9-19) ritkának mondható. Az állományon belüli minél nagyobb genetikai diverzitás eléréshez javasoljuk a 22, legritkább anyai vonalba tartozó egyed keresztezését a gyakoribb haplotípushoz tartozó egyedekkel. A keresztezéseket minél nagyobb számú kombinációban érdemes kivitelezni. A tenyészállomány kialakításába azonban kizárólag olyan egyedeket ajánlott bevonni, melyek megfelelnek a fajtasztenderd követelményeinek és az eredeti élőhelyről, a Velencei tóból származnak, így növelhető a ritka anyai vonalokhoz tartozó genetikai háttér sikeres megőrzésének valószínűsége. Munkákat az Európai Halászati Alap, Halászati Operatív Program III. tengelyének („Európai Halászati Alap: a megújuló halászatért” – az Európai Unió és Magyarország támogatásával) projekt támogatta.

Kulcsszavak: Ponty, diverzitás, genetika, mitokondriális genom D-loop, carp, diversity, genetics, mitochondrial genome D-loop

MITHOCHONDRIAL GENETIC ANALYSES OF THE VELENCE WILD CARP BROOD STOCK CANDIDATES.

Abstract

Our aim was to evaluate the genetic diversity of the broodstock candidates of the Velence wild carp (*Cyprinus carpio carpio* morpha *hungaricus*) based on mitochondrial DNA sequences, and to develop a cross-breeding plan to maintain or to increase the genetic diversity. 150 specimen were sampled during the experiment and 135 mitochondrial control (D-loop) region DNA sequences were determined. Based on the data 19 maternal line were classified. The most

common haplotype (Hap_3) was present in 94 individuals, while the rarest haplotypes (Hap_4, 6, and 19) were present only in one specimen, respectively. Based on the frequency of the genotypes 16 haplotypes (Hap_2, 4-7 and 9-19) are belonging to the rare category. To achieve the greatest genetic diversity within the stock, we recommend crossing 22 individuals from the rare maternal lines with the more common haplotypes. It is worthwhile to implement crossings in as many combinations as possible, to increase the probability of successful conservation of rare maternal lines and genetic backgrounds. But, only those specimens should be selected for breeding that meets the landrace standards and originated from the Lake Velencei. The work was supported by the European Fisheries Fund Fisheries Operative Program III. axis, European Fisheries Fund for Renewable Fisheries provided by the EU and Hungary.

Irodalmi áttekintés

Tenyésztett halállományainkban gyakori jelenség a kevés tenyészegyed felhasználása miatt kialakuló genetikai háttér beszűkülés, mely a beltenyésztettség növekedéséhez és az utódgenerációk alkalmazkodóképességének csökkenéséhez vezet. Az alacsony heterozigotitás azonban nem csak a mesterségesen szaporított tógazdasági állományokban okoz problémát, de az elszigetelten, kis egyedszámmal rendelkező állományokban is előfordulhat. Az ilyen szűk genetikai háttérrel rendelkező állományok a természetes vízi környezethez is nehezebben alkalmazkodnak, nő az elhullás esélye.

A velencei-tavi vadponty egy olyan elszigetelődött fejlődő pontyváltozat, mely 2013 decemberében kapta meg a végleges tájfajta elismerést (*Gorda és Borbély, 2013*), és amelynek fenntartására egy minél szélesebb genetikai háttérű anya állományt kívánnak létrehozni. A pontyok között kisméretűnek számító tájfajta legismertebb fenotípusos bélyege a jellegzetesen megnyúlt pikkelyes test, a mérsékelt magas hát és az ún. „kosfej”. Ívási ideje korábbra tehető a többi ponty tájfajtaénál, de bizonyos környezeti körülmények eltolhatják azt, így nem kizárt a fajták/változatok közötti hibridizáció sem (*Szentes, 2000*). Az állományokban végbemenő változások felmérésének egyik lehetséges eszköze az anyai leszármazást követő mitokondriális genom vizsgálat molekuláris genetikai módszerekkel (*Avise, 1994, Linda és Paul, 1995*). A mitokondriális DNS marker vizsgálatok mára már általánosnak mondhatók az egyes rendszertani osztályok esetében, úgy, mint a halaknál (*Avise és mtsai., 1986, Heist és Gold, 1999*), madaraknál (*Baker és Marshall, 1997, Zink és mtsai., 2000*), emlősöknél (*Menotti-Raymond és O'Brien, 1993*), és a hüllőknél (*Avise és mtsai., 1998, Shanker és mtsai., 2004*). Jelen munka során a mitokondriális DNS kontroll (D-loop) régióját használtuk molekuláris markerként a Velencei-tavi kosfejű pontyok állományvizsgálatához. A módszer lehetővé teszi olyan szaporítási tervek kidolgozását, melyek alapján lehetőség nyílik az állományon belüli megtalálható anyai vonalak és a diverzitás megőrzésére, a heterozigotitás növelésére.

Anyag és módszer

Mintavétel

Vizsgálatainkhoz a Magyar Országos Horgász Szövetség (MOHOSZ) Kajászói gazdaságában vettünk mintákat, ahol a Velencei-tavi vadponty tájfajta anyajelölt állományát tartják. Altatást követően 150 egyed farokuszójából vettünk szövetmintát. Mind a 150 halat egyedi PIT Tag (Passzív Integrált Jeladó - Passive Integrated Transponder) azonosítóval láttuk el

az egyedek későbbi nyomkövetésének érdekében. A mintákat steril, abszolút etanol tartalmazó centrifuga csövekbe helyeztük és a későbbi felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

DNS izolálás

A szövetekből Omega Biotech gyártmányú E.Z.N.A. Tissue DNS izoláló készlet segítségével nyertük ki a DNS-t, a gyártó előírásai szerint. A proteáz enzimmel végzett lízist egy több lépcsős tisztítási reakció követte, mely során mintánként 100 μl eluáló pufferben leoldott DNS-t kaptunk. A DNS koncentrációt és tisztaságot ezt követően agaróz gélelektroforézissel és spektrofotométeres méréssel ellenőriztük. Majd a mintákat 50 ng/ μl töménységre hígítottuk a további felhasználáshoz.

PCR és szekvenálás

Az izolált DNS-ből a vizsgálni kívánt mitokondriális DNS ún. D-loop régióját polimeráz láncreakcióval (PCR) felszaporítottuk. A reakcióelegy komponensei a következők voltak egy mintára számítva 2,50 μl 10x puffer ((NH_4) $_2\text{SO}_4$), 0,75mM MgCl_2 , 0,12 mM dNTP, 0,13 μM Primer Forward, 0,13 μM Primer Reverse, 0,05 U/ μl Taq, 13,00 μl MQ víz. A felsokszorozáshoz a Carp-pro2-F (5'- TCACCCCTGGCTCCCAAAGC-3') és Carp-Phe2-R (5'- CTAGGACTCATCTTAGCATCTTCAGTG-3') primereket használtuk. A reakciókat Applied Biosystems gyártmányú 2720 Thermo cycler PCR gépben végeztük el a következő hőprofil alkalmazásával: 95°C 3 perc, melyet 35 ciklus követett 95°C -on 30 másodpercig, 50°C -on 30 másodpercig és 71°C -on 1 percig majd zárásként egy ciklus 72°C -on 3 percig. A PCR eljárást követően a templátot a reakció közegből enzimes emésztéssel ((Exonukleáz I. (10 U/ μl), és Alkalikus foszfatáz - FastAP (1U/ μl)) megtisztítottuk a reakció során fennmaradt primerektől és nukleotidoktól.

A termékből a Carp-pro2-F primer, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) felhasználásával elvégeztük a szekvenáló reakciót, majd alkoholos kicsapással kinyertük a jelölt DNS fragmenteket. A pelletet HIDI formamidban feloldottuk és 24 órás pihentetést és a kettős szál denaturálását követően a Gödöllői Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén található ABI Genetic Analyser Model 3130 (Applied Biosystems) készüléken elvégeztük a bázissorrend meghatározást.

Adatok elemzése

A kromatogramok kiértékelését és a szekvencia illesztéseket, valamint a haplotípusok viszonyát jellemző filogenetikai fát a MEGA 7.0.5 (Kumar és mtsai., 2015) programmal készítettük el. A haplotípus csoportokat és a nukleotid diverzitást a DnaSP 5.10 (Librado és Rozas, 2009) szoftver segítségével határoztuk meg. A haplotípusok gyakoriságát EXCEL (Microsoft) segítségével jelenítettük meg. A törzsfá elkészítéséhez Maximum Likelihood módszert alkalmaztunk, amely a Tamura-Nei modellen (Tamura és Nei, 1993) alapszik. A számításokhoz 3000-es bootstrap értéket alkalmaztunk. A filogenetikai fán a csomópontok mellett az egyes haplotípusok egymás mellé helyeződésének százalékos valószínűsége látható a bootstrap teszt alapján. A bootstrap konszenzus törzsfá megjelenítésekor a külcsoportnak a leggyakoribb Hap_3-as haplotípust választottuk.

Eredmények

A kísérletünk során 135 egyed mitokondriális DNS kontroll (D-loop) régiójának szekvenciáját határoztuk meg. A vizsgálatokban felhasznált konszenzus szekvencia 661 bázis hosszúságú, amelyből 606 bázis változatlan volt mind a 135 egyedben. 55 bázis esetében volt polimorfizmus kimutatható (1. ábra), ebből 34 pozícióban csak egy-egy egyedben, 21-nél pedig több egyedben változott az öröklött szekvencia nukleotid sorrendje. Az 55 nukleotid pozíció alapján összesen 19 különböző haplotípust tudunk elkülöníteni. Az egyes haplotípusok között fellelhető különbség viszonylag szűk skálán, 1 nukleotidtól 13 nukleotidig változott (1. ábra). Az egyes haplotípusok előfordulási gyakorisága a vizsgált egyedek számához viszonyítva széles skálán mozgott (2. ábra). A Hap_1-es haplotípusba 12 egyed tartozik, a Hap_2-esbe 4, a Hap_3-asba 94, a Hap_4-estől a Hap_6-esig 1-1 egyed tartozik, a Hap_8-asba 7, a Hap_9-esbe 4, a Hap_10-estől a Hap_19-es haplotípusig pedig ismét csak 1-1 egyed tartozik. Az összehasonlító filogenetikai törzsfa alapján (3. ábra) a haplotípusok három nagyobb csoportba oszthatók. A leggyakoribb 3. haplotípustól a legnagyobb evolúciós távolságban a 17-es, az 1-es és 2-es haplotípusok, míg a legközelebb a 19-es és 7-es haplotípusok vannak.

1. ábra: A velencei tavi anyajelölt ponty állomány d-loop haplotípusai közötti eltérés

	10	20	30	40	50
	*	*	*	*	*
Hap_3	TTTATAGCATT	TAGGTAACCCT	TAGCGGCTTT	TGTATAGGGT	TTTTTCTTATTTGT
Hap_1	TTTC...A...	GA.GC.....
Hap_8T.....
Hap_2	G.T.T...TAA..	CGA.....C.....
Hap_9A.....
Hap_4C.....C.....	C.....C.....C.....A..
Hap_5T.....C.....
Hap_6TT.....A.....
Hap_7G.....
Hap_10	A.....G.....	A.....
Hap_11TT.....
Hap_12	A..C.A.AG.GAC.AA.TAG.A.
Hap_13C.....
Hap_14A..AG.CAC.....
Hap_15	.C.....ACAA.....	C.....G.....
Hap_16C.....
Hap_17	..AG.TT.....	TTTC...A...	GA.GC.....
Hap_18T.....C.....	G.....
Hap_19	A.....

Figure 1: The differences of the d-loop haplotypes in the Velence wild carp stock

2. ábra: A velencei tavi ponty anyajelölt mitokondriális haplotípusainak gyakorisága

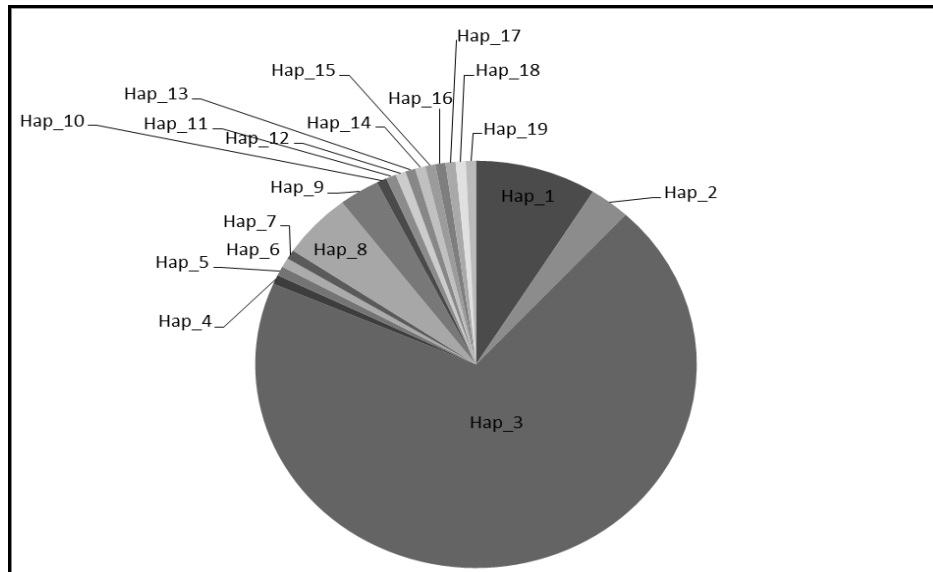


Figure 2: The distribution of the Velence wild carp mitochondrial haplotypes

3. ábra: A velencei tavi ponty állomány mitokondriális haplotípusainak Maximum Likelihood filogenetikai analízise

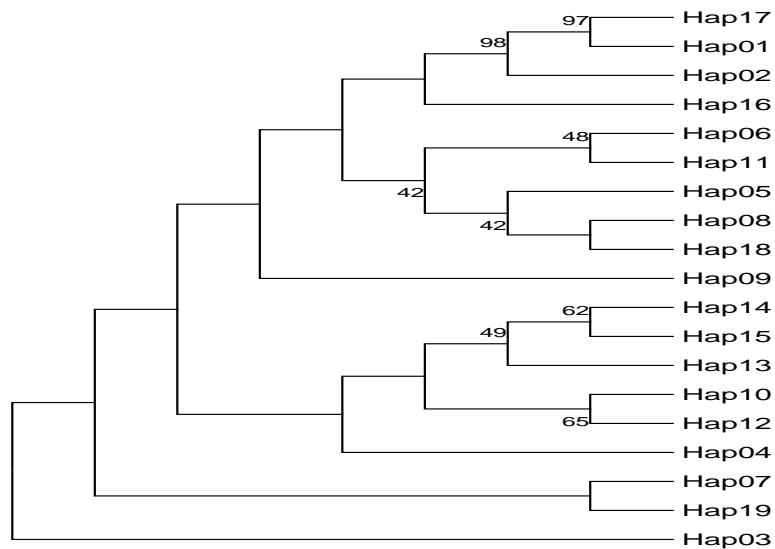


Figure 3: The phylogenetic tree of mitochondrial haplotypes of the Velence wild carp stock made of the maximum likelihood method.

Eredmények értékelése

A velencei-tavi ponty anyajelölt állományának mitokondriális DNS vizsgálata során összesen 19 haplotípust tudtunk elkülöníteni a 135 egyedből. Ebből 16 ritka (Hap_2, Hap_4, Hap_5, Hap_6, Hap_7, Hap_9, Hap_10, Hap_11, Hap_12, Hap_13, Hap_14, Hap_15, Hap_16, Hap_17, Hap_18, Hap_19), 2 közepesen gyakori (Hap_1, Hap_8), 1 pedig gyakori (Hap_3) típus. Mivel az a célunk, hogy minél nagyobb genetikai diverzitással lehessen fenntartani az állományt, ezért a ritkább haplotípusok felértékelődnek a gyakoribbakkal szemben. Ideális esetben mind a 16, ritkább haplotípusba tartozó egyedeket ajánlanánk továbbtenyésztésre, de az általunk vizsgált egyedek még csak kétnyarasak és ivaruk nem ismert. Emiatt a felnevelés után lehet kiválogatni azokat a nőivarú egyedeket, amelyek örökítik a ritka mitokondriális haplotípusokat, és azokat tovább tenyésztetni. A ritkább haplotípusú hímivarú vadpontyokat is be lehet venni a tenyésztésbe, ugyanis nagy valószínűséggel ezek az egyedek nukleáris genomi DNS-ükben is hordozzák az eltérő anyai vonalból származó, eltérő nukleáris genomot, különösen ha az egy nagyobb evolúciós távolságot mutató vonal. Egy egyed minél nagyobb számú kombinációban érdemes bevinni a tenyésztésbe (lehetőség szerint akár 5-6 másik egyeddel ajánlott keresztezni). Ez megfelelő genetikai alapot nyújthat a törzs tenyészállomány következő generációinak kialakításához. Cél, hogy minden tenyésztésbe bevont egyed minél több párosításból származó utóddal járuljon hozzá az utódgeneráció létrehozásához.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni az Európai Halászati Alap, Halászati Operatív Program III. tengelyének („Európai Halászati Alap: a megújuló halászatért” – az Európai Unió és Magyarország támogatásával) és a Kutató Kari Kiválósági Támogatásnak (11476-3/2016/FEKUT) a pályázati lehetőséget, amivel a kutatás hátterét biztosították.

Irodalomjegyzék

- Avise, J.C.* (1994): *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, 512 p.
- Avise, J.C., Helfman, G.S., Saunders, N.C., Hales, L.S.* (1986): Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 83. 12. 4350-4354.
- Avise, J.C., Walker, D., Johns, G.C.* (1998): Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 265. (1407) 1707-1712.
- Baker, A.J., Marshall, H.D.* (1997): Molecular evolution of the mitochondrial genome. In: Mindell, D.P. (ed.): *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego, 51-82.
- Gorda S., Borbély A.* (2013): A velencei-tavi vadponty fajta elismerésére irányuló teljesítményvizsgálat eredménye. Összefoglaló jelentés, HAKI és NÉBIH, 18 p.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K.* (2015): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*.

- Librado, P., Rozas, J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25. 1451-1452.*
- Szentes K. (2000): Vadponty (*Cyprinus carpio m. accuminatus*) a Velencei-tóban. Szakdolgozat, SZIE, Gödöllő, 64 p.*
- Tamura, K., Nei, M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution, 10. 512-526.*
- Zink, R.M., Barrowclough, G.F., Atwood, J.L., Blackwell-Rago, R.C. (2000): Genetics, taxonomy, and conservation of the threatened California gnatcatcher. Conservation Biology, 14. 5. 1394-1405.*