

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 13

Issue 2

Gödöllő
2017

OCHRATOXIN A ÉS BIODEGRADÁCIÓS MELLÉKTERMÉKEINEK VELENCEI PONTY ÁLLOMÁNY DIVERZITÁSÁNAK MIKROSZATELLIT MARKEREKRE ALAPOZOTT GENETIKAI VIZSGÁLATA

Keszte Szilvia¹, Mészáros Orsolya¹, Kánainé Sipos Dóra¹, Balogh Erna¹, Zellei Ágnes²,
Sebestyén András², Balogh Réka¹, Guti 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, 1124 Budapest, Korompai utca 17.
szilvia.keszte@phd.uni-szie.hu

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

Összefoglalás

Vizsgálatunk során a csak a Velencei tóban fellelhető, mindeközéig elkülönülten fejlődő **vadponty** (*Cyprinus carpio carpio morpha acuminatus*) állomány populációgenetikai összetételének elemzését végeztük el, hét mikroszatellit markerrel 36 egyed vizsgálata során. A korábban begyűjtött mintákból genomi DNS-t izoláltunk, elvégeztük (MFW7, MFW6, Cca02, Cca072, Koi41, MFW31, MFW26) a mikroszatellit lokuszok kimutatásához szükséges PCR-reakciókat, majd kapilláris elektroforézis segítségével meghatároztuk az allélok bázispár pontosságú méretét. A mikroszatellit allélok hossza és eloszlása alapján vizsgáltuk az állomány genetikai diverzitását. Az elemzések során meghatároztuk a várt (He) és valós (Ho) heterozigotitást, a populáció Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérését, valamint az egyes markerek adott populációra vonatkozó információs tartalmát (Polymorphic Information Content, PIC). Az alkalmazott markerek többsége magas polimorfizációt (PIC) mutatott (MFW6, MFW7, Cca02, Cca072, MFW31, MFW26), alkalmasnak bizonyultak az állomány vizsgálatához. A mikroszatellit vizsgálatok eredménye alapján egyetlen lokusz (Koi41-42) kivételével mindegyik marker esetén szignifikáns eltérést kaptunk a Hardy-Weinberg egyensúlytól. A teljes populációra nézve magas szignifikáns eltérést kaptunk az egyensúlyi állapottól. A jövőben a genotípusok alapján lehetőségünk nyílik az állomány genetikai diverzitásának növelését célzó, a populáció Hardy-Weinberg egyensúlyát biztosító keresztezési tervet kidolgozni. 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: mikroszatellit, ponty, diverzitás, genetika, microsatellite, carp, diversity, genetics

GENETIC DIVERSITY IN THE VELENCEI CARP STOCK ASSAYED BY MICROSATELLITE MARKERS

Abstract

In this study, we analysed the genetic composition of a separately developing carp stock, named as kosfejű carp („ram-headed” carp- *Cyprinus carpio carpio morpha acuminatus*) due to its phenotypic appearance, only found in the Lake Velence. To study the nuclear genomes of 36 carps, we used seven microsatellites supplemented with the results obtained from an earlier mitochondrial genome analysis. We isolated the genomic DNA from previously collected samples, carried out the PCR reactions suitable for detecting the alleles of microsatellite loci with the primer pairs (MFW7, MFW6, Cca02, Cca072, Koi41, MFW31, MFW26) specific to the loci of interest, then determined the length of the alleles with single-base-pair precision using capillary fragment analysis. Since the polymorphism of microsatellites is caused by allele-length changes, they are useful tools for the study of the genetic diversity of the stocks tested. During the course of the analysis, the observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), and polymorphic information content (PIC) of the markers for given population were computed. Additionally, we tested the deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium in the stock. The results of the microsatellite analysis showed that the stock deviated significantly in all locus, except Koi41-42 from the Hardy-Weinberg equilibrium and the estimated heterozygosity of the whole population is lower than expected. Most of the markers used in this study showed high polymorphism (MFW6, MFW7, Cca02, Cca072, MFW31, MFW26), therefore, are qualified for the analysis of the stock. Using more markers in the future will enable us to develop a cross design for raising genetic diversity. 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

A ponty tenyésztett halaink közül a legrégebben domesztikált fajok közé tartozik. Hazánkban tenyésztése igen népszerű, az összes haltermelés kb 80%-át teszi ki (Horváth, 2000). Jelenleg több mint 30 államilag elismert tájfajtánk van, melyek némelyike külföldről származik (Bakos és Gorda, 2001). Ezek közül a legfiatalabb a velencei-tavi vadponty. Ez az elszigetelődött fejlődő tőponty változat 2013 decemberében kapta meg a végleges tájfajta elismerést (Gorda és Borbély, 2013). A pontyok között kisméretűnek számító hal legismertebb fenotípusos bélyege a megnyúlt, hengeres testforma, ún. kosfej. ami különböző színváltozatai ellenére kiváló megkülönböztető bélyeg. Ívási ideje általában megelőzi, a tóban szintén megtalálható, tenyésztett tájfajták ívási idejét, azonban az időjárástól is függően előfordulhat időbeli átfedés a szaporodási időszakokban. Ez komolyan veszélyeztetheti a velencei-tavi vadponty genetikai állományának integritását. Ezért a kajászói halgazdaságban a tájfajta fenntartására egy tenyészállományt alakítottak ki és tartanak fenn.

Ez nem csak a fajta genetikai állományának védelmét, de a tervszerű szaporítását és irányított telepítését is lehetővé teszi, ami körültekintő tenyésztői munka mellett biztosíthatja ennek a különleges vadponty változatnak a fennmaradását. Vizsgálatunk célja a tenyészállományból származó anyajelöltek genetikai diverzitás vizsgálata, a beltenyésztettség kialakulásának elkerülése érdekében, mivel ez az utód generációk alkalmazkodó képességének csökkenéséhez vezethet. Az alacsony heterozigotitás nem csak a mesterségesen szaporított állományokban okozhat problémát, de

az innen kihelyezett egyedek később a természetes vízi környezethez is nehezebben alkalmazkodnak, nő az elhullás esélye. A molekuláris markerekkel végzett vizsgálatok általánosan elterjedt eszközei a természetes vízi és mesterséges populációk diverzitási vizsgálatának. A genetikai háttér minél pontosabb ismerete lehetőséget ad a beltenyésztettség felmérésére, valamint vérfrissítési javaslatok, keresztezési tervek kidolgozására. A vizsgálatokhoz a ponty estében számos, más vizsgálat során már sikeresen alkalmazott mikroszatellit (*Croojimans, 1997, David és mtsai., 2001; Yue és mtsai., 2004*) markereket használtunk.

Anyag és módszertan

Mintavétel

Kísérleteink elvégzéséhez a Magyar Országos Horgász Szövetség (MOHOSZ) Kajászoői gazdaságából gyűjtöttünk mintákat, ahol a Velencei-tavi vadponty tájfajta anyajelölt állományát tartják. A halakat egyedi PIT Tag azonosítóval láttuk el az állomány későbbi nyomon követésének érdekében és a testméret adatok felvétele mellett farokúszó szövetmintákat gyűjtöttünk, amelyeket a későbbi felhasználásukig abszolút etanolban -20°C -on tároltuk.

DNS izolálás

A szövetekből DNS-t izolálaltunk Omega Bio-tek gyártmányú E.Z.N.A. Tissue DNS izoláló készlet felhasználásával. Ennek során a proteáz enzimmel végzett lízist egy több lépcsős tisztítási reakció követte. A kinyert DNS-t $100\ \mu\text{l}$ eluáló pufferben oldottuk fel. Ezt követően a DNS koncentrációját és tisztaságát $1,5\ \%$ -os agaróz gélen TBE pufferes (Tris-bórsav EDTA) közegben elektroforézissel és spektrofotométeres méréssel határoztuk meg. A mintákat $50\ \text{ng}/\mu\text{l}$ töménységre hígítottuk a további felhasználáshoz.

Mikroszatellitek kimutatása

A mikroszatellit markerek kimutatására PCR (Polymerase Chain Reaction) vizsgálatot végeztünk. A mikrosatelliteket, más hazai ponty állományokon (Akasztó, Szeged) már általunk is sikeresen tesztelt markerek közül választottuk ki (MFW6, MFW7, Koi41-42, Cca02, Cca72, MFW31, MFW26). Ez egyfelől lerövidíti az optimalizálásra fordított időt, másrészt a későbbiekben ezekkel az állományokkal is összevethető eredményeket kapunk. A PCR reakció $25\ \mu\text{l}$ térfogatú reakcióban ment végbe. A reakció összetétele a következő volt: $2,5\ \mu\text{l}$ 10X puffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $2,0\ \text{mM}$ MgCl_2 , $1,5\ \text{mM}$ dNTP, $1,1\ \text{mM}$ forward primer, $1,1\ \text{mM}$ reverse primer, $1,1\ \text{mM}$ PET-floureszcens primer, $0,34\ \text{U}/\mu\text{l}$ Taq polimeráz, $150\ \text{ng}$ templát DNS. Az MFW7, Koi41-42, Cca02, Cca72, MFW31, MFW26 markerek esetén a reakció az *1. táblázatban* bemutatott hőprofil szerint ment végbe, míg az MFW6 marker esetén alkalmazott hőprofil a *2. táblázatban* látható. A mikrosatellitek alléljainak bázispár pontosságú méretét ABI Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems) készülék segítségével kapilláris fragmentanalízis révén határoztuk meg, GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) molekulásúly markerhez viszonyítva. A méret meghatározást GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems) szoftverrel végeztük.

1. táblázat: Ponty állományok vizsgálatokor alkalmazott PCR reakció hőprofilja

Iniciáció	3 min 94 °C	1X
Denaturáció	30 sec 94 °C	40X
Anelláció	30 sec 56 °C	
Elongáció	1 min 30 sec 72 °C	
Végső elongáció	5 min 68°C	

*Table 1: PCR conditions of microsatellites analysis for carp examinations.***2. táblázat: Ponty állományon alkalmazott PCR reakció hőprofilja az MFW6 mikroszatellit markerrel**

Iniciáció	2 min 94°C	
Denaturáció 1	15 sec 94°C	2 X
Anelláció 1	1 min 56°C	
Elongáció 1	2 min 72°C	
Denaturáció 2	15 sec 94°C	
Anelláció 2	20 sec 56°C	35X
Elongáció 2	40 sec 72°C	
Végső elongáció	9 min 72°C	

Table 2: PCR temperature profile of MFW6 microsatellite marker for carp examination Populációgenetikai analízis

Az egyes populációgenetikai számításokhoz Microsoft Excel, Microsatellite Toolkit ver. 3.1.1 (Park 2001) és GenAlEx ver. 6.502 (Peakall & Smouse 2012; Smouse és mtsai. 2015), valamint a Genepop ver. 4.1 szoftvereket (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008) alkalmaztunk. Meghatároztuk a jellemző alléleket, illetve allél tartományokat, a várt (He) és valós (Ho) heterozigotitási értékek alapján a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést, valamint a markerekre jellemző PIC értéket.

Eredmények és értékelés

Az általunk vizsgált 7 mikroszatellit marker (MFW6, MFW7, MFW26, MFW31, Koi41-42, Cca02, Cca72) alkalmasnak bizonyult a velencei kosfejű vadponty anyaállomány vizsgálatára. A populációra kimutatott allélok száma, illetve a PIC-értékek alapján a vizsgált markerek többsége az igen informatív kategóriába esett, a Koi41-42-es marker kivételével (3. táblázat).

A populációra jellemző allél tartományok a vártak megfelelően alakultak (3. táblázat). Bár a becsült (Ho) heterozigotitási értékek minden esetben alacsonyabbak voltak a várt (He) (4. táblázat) heterozigotitás értéknél és csak a Koi 41-42-es marker esetében nem volt szignifikáns az eltérés (4. táblázat). A populáció egészére nézve a P-érték magasan szignifikáns eltérést mutatott, az állomány tehát nem felel meg a Hardy-Weinberg egyensúlynak.

3. táblázat: A kosfejű ponty állományon alkalmazott mikroszatellitek PIC (polimorf információs tartalom) értéke és jellemzésük

	PIC	Allélszám	Méret	Forrás
MFW7	0,745	7	209-232	<i>Crooijmans, 1997</i>
MFW6	0,737	12	144-207	<i>Crooijmans, 1997</i>
Cca72	0,679	9	254-315	<i>Yue és mtsai., 2004</i>
Koi41-42	0,170	3	264-270	<i>David, 2001</i>
Cca02	0,663	9	176-219	<i>Yue és mtsai., 2004</i>
MFW31	0,886	15	272-330	<i>Crooijmans, 1997</i>
MFW26	0,819	10	136-166	<i>Crooijmans, 1997</i>

Table 3: The PIC value for each locus in the „ram-headed” carp population

4. táblázat: A velencei kosfejű ponty anyaállomány várt és becsült heterozigotitási értékei az alkalmazott 7 mikroszatellit esetén

	EH	OH	P
MFW7	0,787	0,371	***
MFW6	0,773	0,667	*
Cca72	0,729	0,444	***
Koi41-42	0,182	0,167	ns
Cca02	0,703	0,444	***
MFW31	0,908	0,657	***
MFW26	0,851	0,472	***

A mikroszatellit lokuszok várt (He) és valós (Ho) heterozigotitási értékei és szignifikancia szintjei (ns=nem szignifikáns, * $P < 0.05$, ** $0.001 < P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

The mean expected and observed heterozigotitási and P value in the „ram-headed” carp population (ns= not significant; * $P < 0.05$, ** $0.001 < P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Következtetések, javaslatok

Mivel az eredmények alapján az állomány szignifikánsan eltér a Hardy-Weinberg egyensúlytól és a markerek szintjén csak egy marker estében nem volt a heterozigotitási csökkenés szignifikáns mértékű, érdemes lenne az anyajelölt állomány genetikai variabilitását növelni a korábbi generáció még nem szaporított egyedektől származó utódok bevonásával, a fajtajellegek megtartása mellett. A jövőben a keresztezési terveket, a populáció genetikai változatosságának javítása érdekében, az egyes lokuszok alapján legváltozatosabbnak ítélt, illetve a ritka allélokot hordozó egyedek, illetve a korábbi tenyésztésgeneráció még nem használt egyedek, vagy a fajta természetes élőhelyéről befogott egyedek bevonásával célszerű kialakítani.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat az Európai Halászati Alap, Halászati Operatív Program III. tengelye (“Európai Halászati Alap: a megújuló halászatért”- az Európai Unió és Magyarország támogatásával) és a Kutatókari kiválósági Támogatás (9878-3/2016/FEKUT) pályázatait támogatták.

Munkánk segítségével köszönet illeti a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének és a Szent István Egyetem Regionális Egyetemi Tudásközpont minden dolgozóját.

Irodalomjegyzék

- Bakos, J., Gorda, S. (2001): Genetic resources of common carp at the Fish Culture Research Institute, Szarvas, Hungary. FAO Fisheries Technical Paper. No. 417. Rome, FAO. 106 pp.
- Crooijmans, R., Bierbooms, V.A.F., Komen, J., Vander Poel, J.J., Groenen, M.A.M. (1997): Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Anim Genet*, 28. 129–134
- David, L., Rajasekaran, P., Fang, J., Hillel, J., Lavi, U. (2001): Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers. *Mol Genet Genom*, 266. 353–362
- Gorda S., Borbély A. (2013): A velencei-tavi vadponty fajta elismerésére irányuló teljesítményvizsgálat eredménye. Összefoglaló jelentés, HAKI és NÉBIH, 18 p.
- Horváth L. (2000): Halbiológia és haltenyésztés; Mezőgazda Kiadó, Budapest
- Park, S.D.E. (2001): 'Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection', University of Dublin.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995): GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86. 248-249.
- Rousset, F. (2008): 'Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux', *Molecular Ecology Resources*, 8. 103-06.
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2012): 'GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update', *Bioinformatics*, 28. 2537-39.
- Smouse, P.E., Whitehead, M.R., Peakall, R. (2015): 'An informational diversity framework, illustrated with sexually deceptive orchids in early stages of speciation', *Molecular Ecology Resources*, 15. 1375-84.
- Szentes K. (2000): Vadponty (*Cyprinus carpio m. accuminatus*) a Velencei-tóban. Szakdolgozat, SZIE, Gödöllő, 64 p.
- Yue, G.H., Ho, M.Y., Orban, L., Komen, J. (2004): Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. *Aquaculture* 234. 85-98.