

Zebradánió (*Danio rerio*) ginogenezis interspecifikus mélyhűtött spermával

Kovács Balázs¹, Bercsényi Miklós², Csenki Zsolt¹, Bakos Katalin¹, Kovács Róbert¹, Csepeli Andrea¹, Németh Sándor², Uri Csilla¹, Bokor Zoltán¹, Bernáth Gergely¹, Horváth Ákos¹, Urbányi Béla¹, Orbán László³

¹Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék, Gödöllő

²Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Állattudományi és Állattenyésztési Tanszék, Állattan és Akvakultúra Csoport, Keszthely

³Reproductive Genomics Group, Temasek Life Sciences Laboratory, Singapore



Bevezetés

Más állatfajokkal ellentétben a zebradánió (*Danio rerio*) esetén nem ismertek beltenyésztett, erősen homozigóta vonalak, annak ellenére, hogy a kutatásokban ez nagy előnyt jelenthetne. Mindemellett halaknál számos módszert dolgoztak ki (androgenezis, ginogenezis, mesterséges hermafroditizmus- öntermékenyítés, különböző keresztezési eljárások) amelyek alkalmasak homogenitás gyors növelésére. Mindössze két ginogenetikus (a Streisinger és munkatársai (1981) által létrehozott C32-es vonal és egy Shinya és Sakai 2011 kialakított vonal) valamint néhány részlegesen beltenyésztett vonalat (A DAR, a C32 és az AB vonalból kialakított SJD, SJC, SJA vonalak, és egy Indiában létrehozott IM vonalat) hozták létre. Azonban ezek genetikai analízise, a várakozásokkal ellentétben magas heterogenitást mutatott. A tesztelt genetikai markerek 7% - a (C32), 11% - a (SJD) 15% - a (SJA) és 5% - a (IM) polimorf volt (Guryev et al. 2006; Bradford et al. 2011; Shinya and Sakai 2011.).

Az, hogy az ilyen vonalak miként őrzik meg ilyen magas genetikai diverzitást a zebradánió esetén nem teljesen világos, azonban a diverzitás túlzott csökkentése a vonalak kipusztulásához vezet. Mindez számos kérdés vet fel, amelyek tisztázására egy erősen homozigóta, beltenyésztett vonal létrehozását tűztük ki célul.

Az ismert módszerek közül a ginogenezis az egyik leggyorsabb módja az erősen beltenyésztett vonalak kialakításának. Azonban a módszer gyakorlati alkalmazását számos nehézség gátolja (pl.: A sperma besugárzása kapcsán felmerülő logisztikai problémák, az embriók és lárvák magas elhullási aránya, eltolt ivararány, kismennyiségű és eltérő minőségű sperma, stb.).

A bemutatott munkánk során ezek elkerülésére, illetve csökkentésére interspecifikus, mélyfagyasztott sperma alkalmazását, kíséreltük meg a zebradánió ginogenezise során.

Anyag és módszer

A kísérletekben AB vonalból származó zebradánió ikrás egyedeket használtunk fel a genetikailag homogén vonal kialakításához. Az ikrát szegfűszeg olajjal elkábított halaktól fejés útján nyerjük. A sejtosztódás beindításhoz gamma sugárzással inaktivált genomú mélyfagyasztott (Horváth et al. 2007) ponty (*Cyprinus carpio*), vagy aranyhal (*Carassius auratus auratus*) spermát használtunk in vitro. A homozigóta egyedek előállításához, az aktiválást követően a haploid zigótákat hősokknak vetettük alá a Streisinger és munkatársai (1981) által kidolgozott protokoll szerint. A megfelelő időben végzett hősokk eredményeként, az elő sejtosztódás gátlása útján, homozigóta diploid (di-haploid) egyedek jöttek létre. A túlélő egyedeket tartása és nevelése ZebTec (Tecniplast) zebradánió tartó recirkulációs rendszerben történt. A ginogenetikus egyedek ivarérését követően a további generációk előállítása természetes ívatás útján zajlott a "Zebrafish Book" javaslatainak megfelelően (Westerfield 2000).

Eredmények

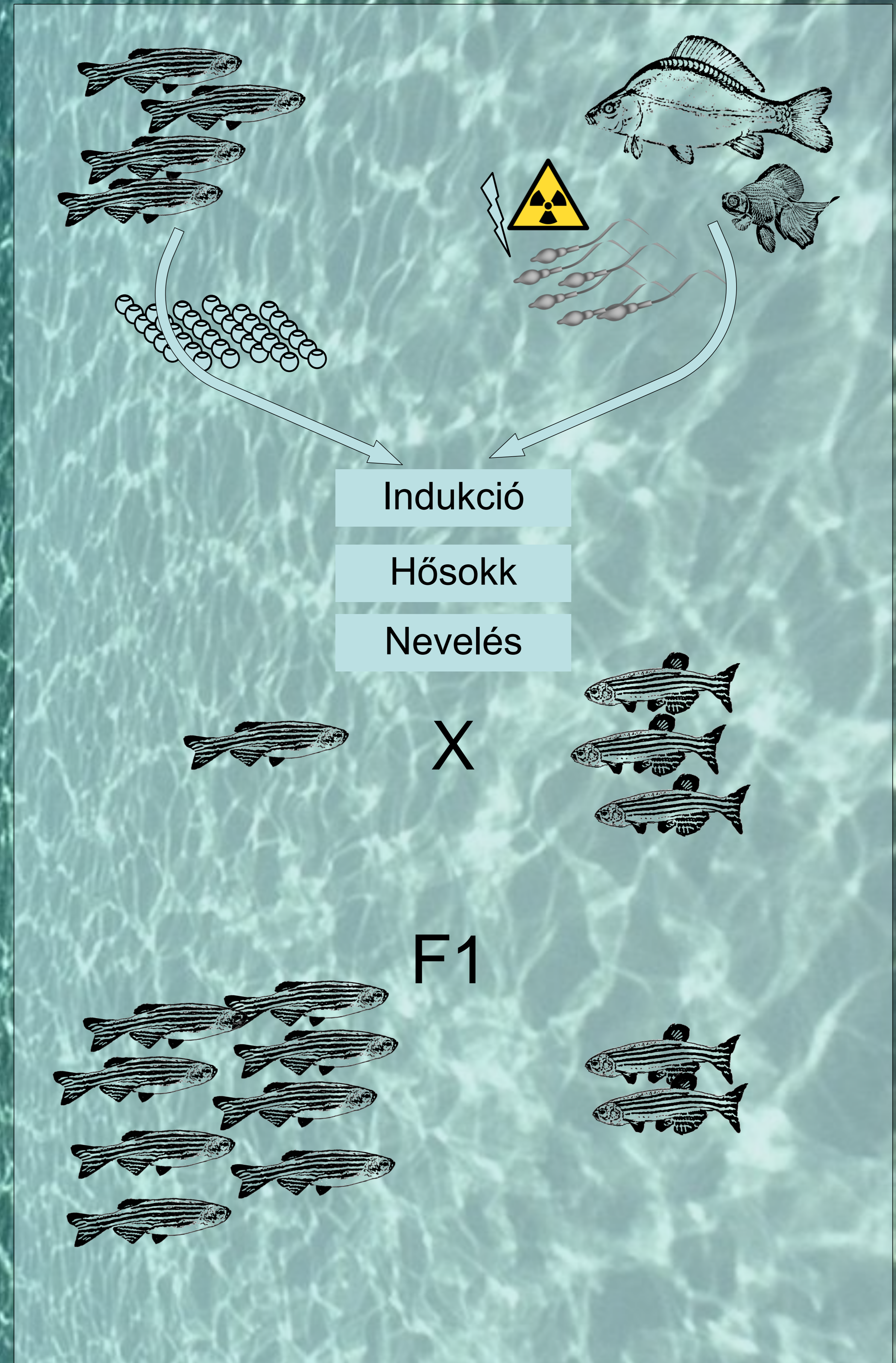
Az interspecifikus ginogenezis során sikeresen hoztunk létre egyedeket. Összesen mintegy 284 egyed kelt ki a több mint 18000 felhasznált ikrából. Ezek legtöbbje különböző fejlődési rendellenességekben, különböző fejlődési stádiumokban elpusztult. Mindössze 14 egyed érte el a kifejlett kort. Közülük öt (4 tejes és egy fenotípusosan ikrás) egyede nem szaporodott. Hét hím és két ikrás fertilisnek bizonyult. Ezeket az egyedeket használtuk az F1 generáció létrehozásához.

Az F1 utódok közül eddig 46 egyed érte el a kifejlett kor, de mindössze egy mutat hím fenotípust. ség szerinti további bővítését.

Az eredmények azt mutatják, hogy besugárzott és fagyasztott ponty, illetve aranyhal sperma felhasználható ginogenetikus zebradánió egyedek előállítására és a spermakezeléssel kapcsolatos problémák így nagymértékben csökkenthetők. Mindemellett ez a kísérleti beállítás nem teszi lehetővé megfelelő kontrollok alkalmazását az ikrák és a sperma minőségének ellenőrzésére, mivel a termékenyítetlen, haploid és az interspecifikus hybrid utódok (a ponty/aranyhal X zebradánió keresztezés estén) hasonló fenotípussal rendelkeznek és életképtelenek.

A túlélők aránya a várakozásoknak megfelelően nagyon alacsony, 1% alatti volt és megfigyelhető volt a beltenyésztett vonaloknál leírt ivar arány eltolódás is. A ginogenetikus egyedek esetén a hím egyedek aránya nőtt meg, míg az F1 generációban az ikrások aránya volt rendkívül magas (~98%).

feltételezésünk szerint mindez a zebradánió multi-kromoszómális ivar determinációjának köszönhető (Liew et al. 2012) és kilapítható stabil beltenyésztett vonal, azonban ennek további vizsgálata szükséges.



Referenciák

- Bradford és mtsai.:2011 Nucleic Acids Res. 39: 822–829.
Guryev és mtsai.:2006 Genome Res. 16: 491–497.
Horváth és mtsai.:2007 Cryobiology; 54: pp. 251-257.
Liew és mtsai.:2012 PLoS ONE 7(4): e34397
Shinya és mtsai.:2011. G3 1, 377-386.
Streisinger 1986. Genetics. 112(2):311–311
Westerfield 2000. The Zebrafish Book, University of Oregon Press

Köszönetnyilvánítás

A munka OTKA (105393), KTIA-AIK-12-1-2012-0010 és az Emberi Erőforrások Minisztériuma 8526-5/2014/TUDPOL iktatószámú pályázatok támogatásával készül.

