

Néhány horvátországi pontyfajta genetikai jellemzése és visszatelepítése eredeti tógazdaságaikba

Lehoczky István¹, Ivelić Duška², Jablan Ines², Treer Tomislav²,
Bakos János¹, Jeney Zsigmond¹

¹Halászati és Öntözési Kutatóintézet (HAKI)

²Zágrábi Egyetem, Agrártudományi Kar (UZFA)

Kivonat

Vizsgálataink során magyar és horvát pontyfajták genetikai változatosságát hasonlítottuk össze annak érdekében, hogy eldönthessük a HAKI *ex-situ* génbankjából származó egyedekkel pótolhatjuk-e a Délszláv háború során elveszett és összekeveredett ponty tenyészállományokat. A vizsgálatokhoz hat mikroszatellit DNS markert alkalmaztunk, melyek elemzése után arra a következtetésre jutottunk, hogy a génbanki állományok visszatelepítése biztosítani tudja a fajták elvesztett genetikai változatosságának pótlását és ezzel az elveszetteknek hitt fajták biztos genetikai hátterét.

Bevezető

A volt Jugoszláviában tenyésztett pontyfajták a délszláv háború során nagy valószínűséggel összekeveredtek. Minden tenyésztő úgy gondolta, hogy a tiszta, horvát pontyfajták örökre eltűntek. Ebben a helyzetben a HAKI (Halászati és Öntözési Kutatóintézet) és az UZFA (Zágrábi Egyetem, Agrártudományi Kar) kutatói felismerték a HAKI *ex-situ* ponty élő-génbankjában megőrzött Jugoszláviából származó fajták jelentőségét.

A világ számos országában alakítottak ki a gazdaságilag fontos halfajok genetikai változatosságának megőrzésére mind *ex*, mind *in-situ* génbankokat. Ezek a génbankok főképp fajtamegőrzésre szolgálnak, hiszen a tenyésztett halfajokat nem fenyegeti a kipusztulás veszélye, sokkal inkább az egyes fajták genetikai állományának beszűkülése (bottleneck jelenség), valamint a génsodródás (genetikai drift). Európában minden jelentős pontytenyésztő ország tart fenn génbankot. Csehországban az *in-situ* megőrzésre helyezték a fő hangsúlyt. Az egyes halfajok, fajták, tájfajták megőrzési és fenntartási helyéül a nemesítő, valamint a tenyésztő gazdaságokat jelölték ki (Flajshans és mtsai., 1998; Flajshans és mtsai., 1999). Mindemellert a genetikai változatosság megőrzése érdekében kialakítottak egy *ex-situ* génbankot is, ahol több faj spermáját konzerválták. Lengyelországban (Irnazarow, 1995), Ukrajnában (Serman és mtsai., 1999) és Oroszországban (Kirpitchnikov, 1999) szintén fenntartanak ponty génbankokat, ahol hazai és külföldi fajtákat őriznek.

A HAKI már több mint negyven éve tartja fenn a világ legnagyobb *in-situ* ponty génbankját. A génbank elsődleges feladata kezdetben a különböző nemesítési, keresztezési és hibridizációs munkákhoz szükséges különböző genetikai háttérű pontyfajták biztosítása volt. Később, mivel a tenyésztő gazdaságok eredeti állományai fokozatosan eltűntek vagy más fajtákkal keveredtek, a génbank szerepe is megváltozott. Fő feladatává a megőrzés, a különböző pontyfajták, tájfajták eredeti genetikai háttérrel való fenntartása vált. A génbankban „fénykorában” 17 hazai és 15 külföldi pontyfajtát őriztek (Bakos, 1975). Ezek közül néhány az eredeti kialakulási, tenyésztési helyén ma már nem található meg. Az utóbbi években a fajtamegőrzés támogatási rendszere átalakult, ennek megfelelően a magyarországi tájfajták fenntartását az eredeti fajtatulajdonosok folytatják. Ilyenek a hazai tájfajták közül a palkonyai, a sumonyi, míg a külföldi fajták közül jelen munka elvégzéséig ilyenek voltak a nasicei és a poljanai fajták is (Bakos és mtsai., 1997; Bakos és Gorda, 2001). A génbankban fennmaradt a két tájfajta eredeti génállománya, amely Horvátországban valószínűleg eltűnt. A két intézet együttműködve hajtotta végre a két fajta genetikai vizsgálatát és visszatelepítését Horvátországba.

Anyag és módszer

A genetikai mintákat Magyarországon a HAKI génbankjában fenntartott nasicei és poljanai pontyfajtákból gyűjtöttük (1. és 2. kép), míg Horvátországban a mintagyűjtés Poljanán és Nasicén történt. A 4 fajta összesen 120 egyedből gyűjtöttünk farokúszó mintákat, melyeket 96%-os etanolban tartósítottunk és tároltunk a felhasználásig.



1.kép. Poljanai tükörponty



2.kép. Nasicei tükörponty

A teljes genomikus DNS kivonása a minták fehérjetartalmának Proteináz-K (Proteinase K from *Tritirachium album*, Sigma-Aldrich) enzimmel való emésztése után magas só koncentráció alkalmazásával történt (Miller és mtsai., 1988). A kivont mintákat fagyasztoóban tároltuk a felhasználásig. Felhasználás előtt a minták DNS koncentrációját és a DNS minőségét agaróz gélelektroforézissel, valamint spektrofotométeres (SmartTMSpec Plus, Bio-Rad) méréssel ellenőriztük. A vizsgálatokhoz 80-150 ng/μl koncentrációjú mintákat használtunk. Szükség esetén a mintát hígítottuk, vagy az újbóli kivonás mellett döntöttünk. Ezzel az eljárással a PCR-hez szükséges mennyiségű és minőségű DNS-t tudtuk előállítani a mintákból.

A genetikai vizsgálatokhoz alkalmazott mikroszatellit DNS vizsgálatot már eddig is több kutatócsoport alkalmazta magyar és külföldi pontyfajták

jellemzésére, így ezen markerek alkalmazása vizsgálatunkban kézenfekvő volt (Lehoczky és mtsai. 2005a és 2005b; Bártfai és mtsai., 2003). A vizsgált hat mikroszatellit lókuszt (Crooijmans és mtsai., 1997) esetében fluoreszcens (Cy5) végjelölésű primereket alkalmaztunk.

A PCR (GeneAmp 2700 PCR system, Applied Biosystems) első ciklusa egy 2 perces át tartó denaturáló lépés 94°C-on. Ezt követte harminc cikluson keresztül 40 másodperc 94°C-on (denaturálás), 50 másodperc 55°C-on (primer-annealing) és 90 másodperc 72°C-on (elongáció). Az utolsó ciklus 10 perc 72°C-on, amely lehetővé teszi a *Taq* polimeráz [Sigma-Aldrich] terminális transzferáz aktivitásának kifejeződését. Annak érdekében, hogy a különböző lókuszon megfigyelhessük az allélok változatait, a PCR termékeket 7%-os denaturáló poli-akril-amid gélen (32% formamid, 5% karbamid) választottuk szét ALF Express II (Amersham Biosciences) fragmens analízáló berendezéssel. A PCR termékek méretének meghatározása érdekében az amplifikált termékek mellett méretstandardot (50,100,150,200,250,300,350,400,450 és 500 bp hosszúságú méretstandardok, Amersham-Biosciences) és ismert méretű standard mintákat futtattunk. A gélek értékeléséhez a Fragment Analyser 1.03 (Amersham-Biosciences) szoftvert alkalmaztuk.

Az allélfrekvenciákat, az allélok átlagos számát, a megfigyelt (H_o) és várt (H_e) heterozigotizációs értékeit minden fajta esetében a GENEPOP szoftvercsomag segítségével számítottuk ki (Raymond és Rousset, 1995).

A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést (t próba) és a heterozigóta deficit valószínűségi (p) értékeit ugyancsak a GENEPOP szoftvercsomaggal teszteltük. Az egyes lókuszon megjelenő egyedi alléleket a Convert 1.31-es szoftverrel detektáltam (Glaubitz, 2004). A beltenyésztettség koefficiens értékeit (F_{is} -érték) kiszámításához és összehasonlításához, valamint az allélgazdagság (allelic richness- A_e) kiszámításához és az egyes lókuszon megfigyelt allélok megszámlálásához az F-Stat programot (Goudet, 1995) használtuk. A fajtapárok közötti Nei-féle D_a (Nei, 1972; Nei és mtsai., 1983) genetikai távolság érték kiszámításához (eredményeink értékelése során felhasználtuk az adatbázisunkat, amelyben az eddig elvégzett mikroszatellit vizsgálatok eredményeit tároljuk) és a belőlük generált "családfa" (dendrogram) elkészítéséhez (Neighbour Joining módszer- NJ) a Populations (Langella, 1999) és a Treeview szoftverek (Page, 1996) segítségét vettük igénybe.

A visszatelepítési munka során intézetünkben a két tájfajta egyedét mesterségesen szaporítottuk. 100.000 db háromnapos lárvát adtunk át a két halgazdaság képviselőinek, hogy visszatelepíthessék ezeket eredeti tógazdaságaikba. Az első visszatelepítési kísérlet logisztikai hibák miatt sajnos kudarcot vallott. A HAKI és az UZFA közötti újabb együttműködés eredményeként 2007-ben a három horvát pontyfajta végre visszakerült származási helyére. Az újratelepítési program mindkét gazdaságban sikeres volt. A halakat azóta több alkalommal ellenőriztük és megbizonyosodtunk róla, hogy jól fejlődnek, egészségesek és jó alapot szolgáltatnak majd egy-egy anyaállomány kialakításához.

Eredmények

A két intézet közös munkájának legfőbb eredménye, hogy a horvát fajták stabil, életképes állományai visszakerültek azokba a halgazdaságokba, ahol eredetileg tenyésztették őket (3. kép). A kétnyaras pontyok egészségesek és jól alkalmazkodtak a "régi-új" körülményekhez.



3. kép. Nasicei tükrös pontyok a válogatóasztalon a Dolnij Mihojlacban található Nasice halgazdaságban

A genetikai vizsgálatok során kiderült, hogy mind a génbankban, mind a horvát tógazdaságokban tartott fajták állományai szignifikánsan eltérnek a Hardy-Weinberg egyensúlytól és a várt heterozigotás értékek majdnem minden esetben meghaladják a megfigyelt heterozigotás értékeket, ami a beltenyésztésre utaló jel. A génbankban fenntartott fajták genetikai változatossága meghaladja a horvátországi tógazdaságokban tartott fajtákét. A génbanki fajták átlagos allélgazdagsága (A_r) meghaladja a horvátországi farmokról származó állományokét (1. táblázat), ami azt jelzi, hogy az ott tenyésztett fajták a beltenyésztésnek/nem tervszerű tenyésztésnek köszönhetően elveszítették genetikai változatosságuk egy részét.

1. táblázat: Az egyes fajták lókuszonkénti- és átlagos allélgazdagsága
Fajta

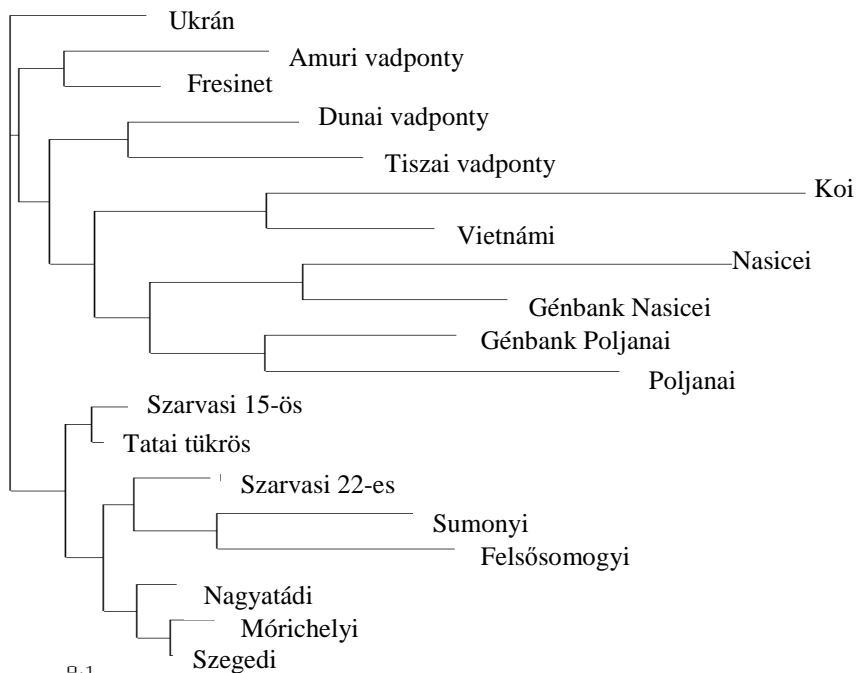
Lókuszt	Fajta			
	Nasicei	Génbanki Nasicei	Poljanai	Génbanki Poljanai
MFW1	8,7	11,0	8,5	11,1
MFW4	7,3	6,1	7,4	10,7
MFW6	5,6	5,4	8,6	7,5
MFW7	7,8	7,5	9,1	10,6
MFW16	4,6	9,4	4,4	10,6
MFW28	7,8	9,5	10,4	8,5
Átlag	7,0	8,1	8,1	9,8

Mind az átlagos lókuszonkénti allélszám, mind pedig az egyedi allélek száma magasabb a génbanki állományok esetében (2. táblázat). A beltenyésztettségi koefficiens (F_{is}) minden esetben magasabbnak bizonyult a horvátországi fajták esetében. A magasabb beltenyésztettség oka nagy valószínűséggel abban keresendő, hogy a háború utáni fajtafrissítő szaporítások során kevés anyahalat használtak. A vizsgálatok hatékonyságát jelzi, hogy a besoroló (assignment) teszt során az egyedek 97,4%-át sikerült besorolnunk saját fajtájába.

2. táblázat: Az allélek száma az egyes fajták és lókuszek esetén, zárójelben az egyedi allélek száma
Fajta

Lókuszt	Fajta			
	Nasicei	Génbanki Nasicei	Poljanai	Génbanki Poljanai
MFW1	10	11 (3)	10 (4)	14 (4)
MFW4	10 (2)	7	8 (1)	13 (2)
MFW6	6	7	10 (3)	10 (3)
MFW7	10 (2)	9 (1)	11 (1)	13 (3)
MFW16	6 (1)	11 (5)	6 (1)	14 (4)
MFW28	9	11 (1)	13 (1)	10 (1)
Σ	51 (5)	56 (10)	58 (11)	74 (17)
Átlag	8,5	9,33	9,6	12,33

A fajtapárok közötti Nei-féle genetikai távolság értékekből készült NJ családfa az 1. ábrán látható. Érdekes megfigyelni, hogy a horvát fajták genetikailag közelebb állnak mind az ázsiai fajtákhoz, mind pedig két vadpontyfajtánkhoz, mint a magyarországi tenyésztett fajtákhoz.



1. ábra. Pontyfajták NJ családfája

A genetikai vizsgálatok igazolják, hogy a génbanki állományok visszatelepítése biztosítani tudja a fajták elvesztett genetikai változatosságának pótlását és ezzel az elveszetteknek hitt fajták biztos genetikai hátterét.

Felhasznált irodalom

- Bakos, J. (1975)** Halgenetikai kutatások fejlődése és eredményei Magyarországon 1975-ig. HAKI, Szarvas, Halhústermelés fejlesztése No 4. 61. pp.
- Bakos, J., Gorda, S., Váradi, L. és Balogh, J. (1997)** Tenyésztő szervezetek szerepe a magyar pontyfajták fenntartásában és nemesítésében. XXI. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, május 25-26. Összefoglalók. 9-13. p.
- Bakos, J. and 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 p.
- Bartfai, R., S. Egedi, G.H. Yue, B. Kovacs, B. Urbanyi, G. Tamas, L. Horvath and L. Orban (2003)** Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers, *Aquaculture* 219(1-4): 157-167

- Crooijmans, R.P.M.A., Bierbooms, V.A.F., Komen, J., Van der Poel, J.J. and Groenen, M.A.M. (1997)** Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animal Genetics*. 28: 129-134.
- Flajshans, M., Linhart, O., Slechtová, V., Slechta V. and Filisten, J. (1998)** Conservation programme of fish gene resources in the Czech Republic. The XVIIIth Genetic Days. September 8-10. Ceske Budejovice. 1-7. p.
- Flajshans, M., Linhart, O., Slechtová and Slechta., V. (1999)** Genetic resources of commercially important fish species in the Czech Republic: present state and future strategy. *Aquaculture*. 173: 471-483
- Glaubitz, J.C. (2004)** CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*. 4: 309-310.
- Irnazarow, I. (1995)** Genetic variability of of Polish and Hungarian carp lines. *Aquaculture*. 129: 215
- Kirpichnikov, V. S. (1999)** Genetics and breeding of Common carp. INRA, Paris. 1-97. p.
- Langella, O. (1999)** Populations, 1.2.28 (12/5/2002) Copyright (C) CNRS UPR9034
- Lehoczky, I., Magyary, I., Hancz, C. and Weiss S. (2005a)** Preliminary studies on the genetic variability of six Hungarian common carp strains using microsatellite DNA markers. *Hydrobiologia* 533.1: 223-228.
- Lehoczky, I., Jeney, Z., Magyary, I., Hancz, C. and Kohlmann, K. (2005b)** Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains kept at the live gene bank at Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary. *Aquaculture*. Special Issue: Genetics in Aquaculture VIII. 247: 45-49.
- Miller, S.A., Dykes D.D. and Polesky H.F. (1988)** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 1215.
- Nei, M. (1972)** Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106: 283-292.
- Nei, M., Tajima, F., and Tateno, Y. (1983)** Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*. 19: 153-170.
- Page, R. D. M. (1996)** TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 12: 357-358.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995)** GENEPOP(1.2): a population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heridity*. 86: 248-249.
- Serman, I. M., Grinzsevszkij, M. B. and Gricunjak, I. I. (1999)** Rozvegyeniya i selekcija rib. BMT, Kiev. 78. p.