

## Előzetes eredmények a ginogenetikus réticsík (*Misgurnus fossilis*) poliploidizációjáról

### Preliminary result of polyploidization of gynogenetic weatherfish (*Misgurnus fossilis*)

† Buza E.<sup>1</sup>, Kolics B.<sup>2</sup>, Kovács B.<sup>2</sup>, Demény F.<sup>1</sup>, Horváth Á.<sup>1</sup>,  
Müllerné T. M.<sup>1</sup>, Urbányi B.<sup>1</sup>, Müller T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Szent István Egyetem, MKK, Gödöllő

<sup>2</sup>Pannon Egyetem, GK, Keszthely

**Kulcsszavak:** PCR-RFLP, SCoT, ploiditás

**Keywords:** PCR-RFLP, SCoT, ploidity

#### Abstract

From interspecific breeding of weatherfish (*Misgurnus fossilis*) eggs and crucian carp (*Carassius carassius*) sperm, viable larvae were hatched. Two female fish were reared until their sexual maturation. The applied PCR-RFLP genetic methods did not show male genom (*C. carassius*) in the juveniles so ginogenetical origin of the two individuals was proven. Eggs from further reproduction of a female fish was fertilised by sperm of weatherfish. Eight viable larvae were hatched (F1R1 generation). The results of chromosome preparation suggested two F1R1 offsprings were tetraploid ( $4n=100$ ) and two offspring hexaploid ( $6n=150$ ). This is the first result that describes hexaploid (150 chromosome number) *M. fossilis*.

A réticsík (*Misgurnus fossilis*) szaporodásának egyik jellegzetessége az eltérő ploiditású utódok létrejötte, melynek szabályszerűségei kevésbé ismertek. A faj jelenleg elfogadott kromoszóma száma  $2n=100$  (Raicu és Taiseacu 1972). Drozd et al. (2010) megfigyelése alapján a triploid, az átmeneti aneuploid és a tetraploid egyedek előfordulási gyakorisága a természetben 1:1:4. Diploid egyedeket nem találtak. Az aneuploid kromoszóma-szerelvénnyel rendelkező egyedek a triploidok és a tetraploidok keresztezésekből származhattak.

Célkitűzésünk a faj egyik szaporodásbiológiai jellegzetességének és a poliploidizációs képességének a vizsgálata.

#### Szaporítás

Két ikrás réticsík anyahalat (testtömeg 17,8–23 g) hormonálisan indukált szaporítási eljárással (Demény et al. 2009) ikrázásra bírtunk, és a lefejt ikratételeket egy széles kárászból (*Carassius carassius*) származó spermaadaggal termékenyítettük. Egy ikratételeből 3 életképes utód kelt ki, melyből 2 ikrást sikerült felnevelni laboratóriumi körülmények között (Buza et al. 2015). A következő évben a két ginogenetikus utód (alaktanra réticsík jegyeket mutattak) ikráit is réticsík apától (testtömeg 24,5g) származó spermával termékenyítettük.

#### Kromoszóma vizsgálatok

A kromoszóma preparálását a frissen kelt vagy néhány napos lárvákból Miskolci et al. (2005) protokollja alapján végeztük. A sejtosztódás metafázisában terült kromoszómákról készült digitális képek alapján történt a kromoszómaszámlálás.

*Molekuláris genetikai vizsgálatok*

A genomiális DNS-t az anyahalak úszójának szövetéből, illetve a lárvák fél testéből izoláltuk fenol-kloroformos eljárással. A vizsgálatban szereplő fajok genomi DNS-ének elkülönítésére egy új PCR-RFLP markert fejlesztettünk, génbanki szekvenciák vizsgálata alapján. A marker primer szekvenciáit és jellemzőit az 1. táblázat tartalmazza. A PCR profil a következő volt: 94 C°-on 3 perc elődenaturáció; 94 C°-on 1 perc, 60 C°-on 1 perc 72 C°-on 1 perc, 38 ciklusban; és 72 C°-on 10 perc végső extenzió. A PCR termékek kimutatása 1,5%-os agaróz gélen (Promega) történt, ethidium-brom festéssel.

1. táblázat. Alkalmazott primerek és restrikciós endonukleázok  
Table 1. Applied primers and restriction endonucleases in the experiment

Primer neve	Szekvencia 5'-3'	PRC termék	Restrikciós endonukleáz	Emésztés utáni fragmentméretek
Rhodopsin 1F	TCACCATCGAGCACAAAGAAGT	583 bp	Taq I	<i>M. fossilis</i> : 154/429bp
Rhodopsin 1R	CGACCATGCGGGTGACCT			<i>C. carassius</i> : 7/147/197/231

*Réticsík × széles kárász (indukált ginogenetikus) szaporítás eredménye*

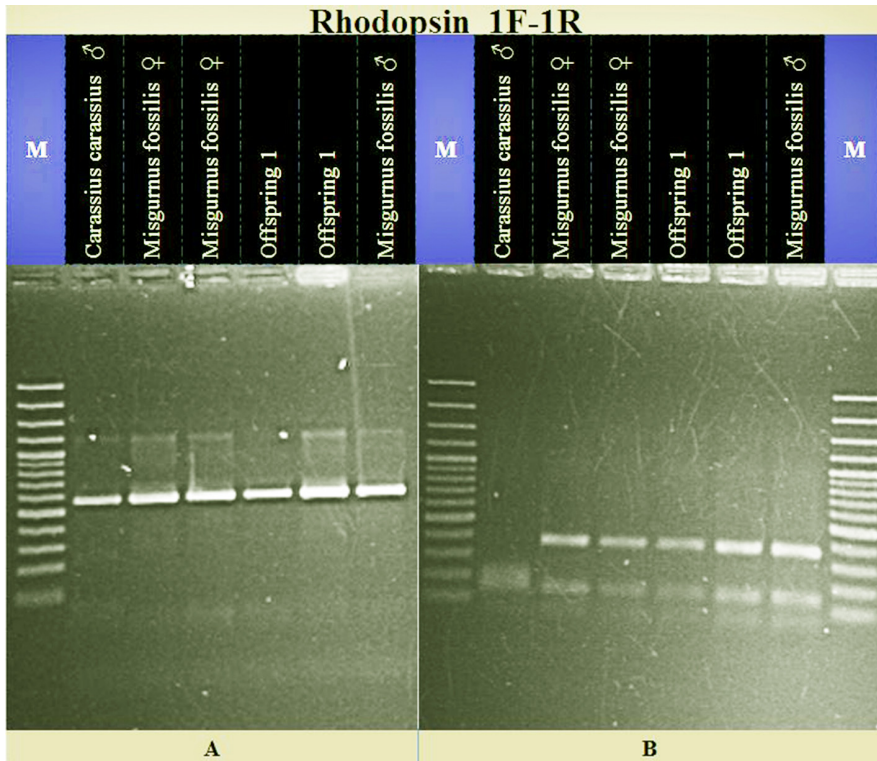
Réticsík ikratételeket széles kárász spermiummal termékenyítve életképes, morfológiailag réticsík utódokat nyertünk: három lárvát kelt ki 1210 ikrából (kelési arány: 0,24%), két ikrás egyed sikeresen felnevelni ivarérett korig.

*Ginogenetikus réticsík × réticsík továbbkeresztelés eredménye*

Következő évben egy ginogenetikus úton létrehozott és sikeresen felnevelt ikrás (testtömeg 11,57 g) indukált szaporítása során kis mennyiségű ikrát nyertünk (ikratömeg: 0,42 g), amelyet réticsík spermiummal termékenyítve (30,34 %-os termékenyülés) nyolc utódot kaptunk (F1R1 generáció). Ezek közül négyen kromoszóma-, illetve DNS-vizsgálatot végeztünk, négy táplálkozott ivadék a nevelésük során elpusztult (tartási hiba).

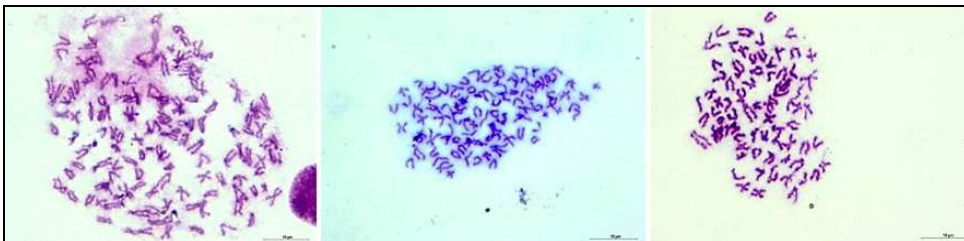
A ginogenetikus úton létrehozott ivadékok kromoszómapreparálása azt mutatta, hogy két egyed hexaploid és két egyed tetraploid volt. Fontos kihangsúlyoznunk, hogy a természetből még nem írtak le tetraploidnál nagyobb kromoszómaszerelvényekkel rendelkező réticsíkokat. A réticsík és kárász anyahalak, illetve utódaik DNS-mintázatának összehasonlítása alapján (1. ábra) apai kárászfragmentek nem detektálhatóak az utódokban. Az alkalmazott PCR-RFLP módszer egyértelműen kizárta az apai *C. carassius* örökítőanyag jelenlétét az utódokban, mivel a nukleáris öröklődésű marker csak az anyai allél jelenlétét mutatta. A kísérletben szereplő különböző ploiditású réticsíkok kromoszómaállományát a 2. ábra mutatja.

A ploiditási szint változásával kapcsolatos eredmény magyarázatában japán kutatók az azonos genusba tartozó *M. anguillicaudatus* fajon végzett megfigyelései segíthetnek (például: Arai et al. 1993; Morishima et al. 1995, 2002; Itono et al. 2006, Li et al. 2011). Ennél a fajnál ginogenetikus utódok hozhatók létre tetraploid ikrás ikrájának ultraibolya fényrel besugárzott normál diploid csíknak, pontynak (*Cyprinus carpio*) vagy aranyhalnak (*C. auratus*) a spermájával (Arai et al. 1993; Morishima et al. 2002). Itono és munkatársai (2006) arról számoltak be, hogy a klónozott csíkok diploid ikrája a premeiotikus endomitózis citológiai mechanizmusa útján keletkezik. Ennek során a kromoszómaszám citokinézis nélkül duplázódik meg a meiózis során, az oogónia kezdete előtt, és két, látszólag normál meiotikus osztódás megy végbe. Tetraploid ikrások és diploid tejések keresztezését követően a második sarki test lefűződésének gátlásával pentaploid egyedek jönnek létre. A triploid és pentaploid kromoszómaállományú ikrások ikrájából életképes utódok fejlődnek, amennyiben normális, haploid spermiummal lettek termékenyítve (Matsubara et al. 1995).



1. ábra. A *Misgurnus fossilis* × *Carrassius carassius* keresztezés PCR-RFLP módszerrel kapott termékei 1.5% agaróz gélen vizualizálva. A: PCR termékek, B: fragmentek a PCR termékek restriktációs endonukleázzal történő emésztése után

Figure 1. PCR products gained from *Misgurnus fossilis* × *Carrassius carassius* crossings visualized on 1.5% agarose gel. A: fragments from the PRC reaction B: Fragments resulting from digesting of PCR products with restriction endonucleases



2. ábra. 150 kromoszómaszámú (hexaploid), 100 kromoszómaszámú (tetraploid) és 75 kromoszómaszámú (triploid) réticsíkvivadékok kromoszómakészlete

Figure 2. Chromosome set of hexaploide, tetraploide and triploide *Misgurnus fossilis* offsprings with chomosome numbers 150, 100, 75 respectively

A ginogenetikusan létrehozott *M. fossilis* feltehetősen poláris testeket ki nem lökő hexaploid utódokat (ikra:  $3n$ , poláris test:  $3n$ ), valamint egy poláris testet tartalmazó tetraploid utódokat (ikra  $3n$ , poláris test) hozott létre. A kísérleteket többszöri ismétléssel végeztük (réticsík × széles kárász keresztezést az ellenőrző réticsík × réticsík termékenyítésekkel 8 alkalommal), ahol a több száz ivadék kromoszóma vizsgálata folyamatban van. Az eddig előzetesen meghatározott ploiditási szintek alapján a réticsík × széles kárász keresztezés eredményeként tetraploid (2 egyed), triploid (4 egyed)

és aneuploid utódok (2 egyed) keletkeztek, míg a réticsík × réticsík keresztezés tetraploid (10 egyed) és aneuploid utódokat (2 egyed) eredményezett. A PCR-RFLP módszer itt is egyértelműen kizárta az apai *C. carassius* örökítőanyag jelenlétét az utódokban (20 egyed). Az adatok pontosítása és az elemszámok kibővítése folyamatban van.

Távolabbi terveink között szerepel, hogy ginogenetikus réticsík × réticsík F1R1 generációjának egyedeiben a fajazonos (réticsík) apai genom jelenlétét mikroszatellit markerekkel detektáljuk, illetve flow citometriai vizsgálati adatokkal összevetve értékeljük a ploiditási szinteket.

#### Köszönetnyilvánítás

A kutatást a Nemzeti Kiválóság Program (11476-3/2016/FEKUT) azonosító számú pályázat támogatta.

#### Irodalom

- Arai, K., Kumi, M., Ryo, S. (1993): Production of polyploids and viable gynogens using spontaneously occurring tetraploid loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 117/3–4: 227–235.
- Buza E., Demény F., Müller T. (2014): A réticsík. p. 179–238. In: Müller T. (ed.): *Veszélyeztetett lápi halak megóvása (lápi póc, réticsík, széles kárász)*. Vármédia Print Kft, Gödöllő, pp. 381.
- Demény F., Zöldi L. G., Deli Zs., Fazekas G., Urbányi B., Müller T. (2009): A réticsík (*Misgurnus fossilis*) szaporítása és nevelése a természetesvízi állományok fenntartása és megerősítése érdekében. *Pisces Hungarici* 3: 107–113.
- Drozd, B., Flajshans, M., Ráb, P. (2010): Sympatric occurrence of triploid, aneuploid and tetraploid weatherfish *Misgurnus fossilis* (Cypriniformes, Cobitidae). *Journal of Fish Biology* 77: 2163–2170.
- Itono, M., Morishima, K., Fujimoto, T., Bando, E., Yamaha, E., Arai, K. (2006): Premeiotic endomitosis produces diploid eggs in the natural clone loach, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Journal of Experimental Zoology* 305A: 513–523.
- Li, Y.-J., Yu, Z., Zhang, M.-Z., Qian, C., Abe, S., Arai, K. (2011): The origin of natural tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) inferred from meiotic chromosome configurations. *Genetica* 139/6: 805–811.
- Matsubara, K., Arai, K., Suzuki, R. (1995): Survival potential and chromosomes of progeny of triploid and pentaploid females in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Aquaculture* 131/1–2: 37–48.
- Miskolczi M., Mihálfy S., Várkonyi E. P., Urbányi B., Horváth Á. (2005): Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 247/1: 119–125.
- Morishima, K., Horie, S., Yamaha, E., Arai, K. (2002): A cryptic clonal line of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae) evidenced by induced gynogenesis, interspecific hybridization, microsatellite genotyping and multilocus DNA fingerprinting. *Zoological Science* 19: 565–575.
- Raicu, P., Taisescu, E. (1972): *Misgurnus fossilis*, a tetraploid fish species. *The Journal of Heredity* 63: 92–94.

#### Authors:

Eszter BUZA, Balázs KOLICS (bkolics@gmail.com), Balázs KOVÁCS (kovacs.balazs@mkk.szie.hu), Ferenc DEMÉNY, Ákos HORVÁTH, Magdolna MÜLLERNÉ TRENÓVSZKI, Béla URBÁNYI, Tamás MÜLLER (Muller.Tamas@mkk.szie.hu)