

Az *Aeromonas hydrophila* fertőzéssel szembeni ellenálló-képesség vizsgálata különböző genetikai háttérű pontyvariánsokon (előzetes eredmények)

Ardó László¹ – Bakos János¹ – Nagy Zoltán Tamás¹ – Rónyai András¹ – Gál Dénes¹ – Bercsényi Miklós² – Bjarne Gjerde³ – Ingrid Olesen³ – Jeney Galina¹ – Jeney Zsigmond¹

¹Halászati és Öntözési Kutatóintézet, Szarvas

²Pannon Egyetem, Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Keszthely

³AKVAFORSK, Institute of Aquaculture, Ås, Norvégia
ardo@haki.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Az *Aeromonas hydrophila* baktérium által okozott szeptikémia betegség világszerte komoly gondot jelent a haltenyésztőknek. Kísérletünkben különböző genetikai háttérű pontyvariánsok ellenálló-képességét vizsgáltuk a betegséggel szemben. 4 pontyfajta (2 vad és 2 tenyésztett) különböző egyedeinek keresztezésével összesen 96-féle genetikai variánst („családot”) állítottunk elő. A családokat 10 grammos méretig neveltük, majd családonként 100 halat egyedi elektronikus azonosítóval láttunk el. A jelölt halakat 5 csoportra osztottuk. Az egyik csoport halait *A. hydrophila*-val fertőztük, majd 2 héten át regisztráltuk az elhullást. A mortalitási adatok alapján populációgenetikai módszerekkel kiválasztjuk a fertőzéssel szemben legellenállóbb és legérzékenyebb családokat.

Kulcsszavak: *Aeromonas hydrophila*, ponty, genetika, rezisztencia

SUMMARY

Septicemia disease caused by the bacterium *Aeromonas hydrophila* is a major problem for fish farmers around the world. In our experiment resistance to the disease was investigated on carp variants with different genetical backgrounds. 96 different genetic variants („families”) were created by crossing various individuals of 4 carp strains (2 wild and 2 cultured ones). Families were reared until reaching the size of 10 grams and 100 fish of each families were marked with an individual electronic identifier. Marked fish were divided into 5 groups. Fish from one group were infected with *A. hydrophila* and mortality were registered during 2 weeks. Based on mortality data, the most resistant and most susceptible families will be selected using population genetics methods.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, common carp, genetics, resistance

BEVEZETÉS

Az *Aeromonas hydrophila* baktérium által okozott szeptikémia nevű halbetegség világszerte komoly problémát jelent a haltenyésztők számára (Plumb, 1999). Egyaránt veszélyezteti a hideg- és melegvizben tartott halfajokat, például a pontyot, az angolnát, a tilápiát, a harcsa- és lazacfélleket (Miyazaki és Yo, 1985; Rahman és mtsai, 1997). Ez

a baktérium a halak normál bélflórájának része és csak a halakat ért stressz hatására képes egy magas mortalitással járó, az állományban gyorsan elterjedő betegséget okozni (Trust és Sparrow, 1974). A baktérium magas szervesanyag-tartalmú vizekben gyakrabban előfordul, mint a kevésbé szennyezett vízben (Jeney G. és Jeney Zs., 1995). Az *A. hydrophila* által okozott betegség legtöbbször nyáron fordul elő, ami valószínűleg a többszörös stresszhatással (magas vízhőmérséklet, alacsony oldottótoxigén-tartalom, stb.) magyarázható. A baktérium elleni védekezést igen megnehezíti, hogy sokféle, egymástól jelentős mértékben eltérő törzse létezik, és jelenleg nem kapható olyan oltóanyag, amely valamennyi törzs ellen hatásos lenne. Bakteriális eredetű halbetegségek megelőzésére és kezelésére gyakran használnak antibiotikumokat és kemoterápiás szereket is, ezek azonban felhalmozódnak a halhúsban és a vízi környezetben, túlzott mértékű használatuk pedig magában hordozza a rezisztens baktériumok kialakulásának lehetőségét. A védekezés egy másik lehetősége a betegséggel szemben ellenálló fajták, genetikai változatok kitenyésztése az ellenálló-képességre történő szelekció módszerével (Gjedrem, 2000). Gazdasági szempontból legfontosabb halfajunk, a ponty esetében azonban igen korlátozottak az ismereteink az egyes fajták *Aeromonas*-fertőzéssel szembeni rezisztenciájáról (Vandeputte, 2003).

A Halászati és Öntözési Kutatóintézet (HAKI) több mint 40 éve hozta létre 18 hazai és 13 külföldi fajtaból álló ponty génbankját, amelyet azóta is folyamatosan fenntart (Bakos és Gorda, 2001). A génbank létrehozásának eredeti célja az áruhal-termelésre használható, nagy növekedési teljesítményű hibridek előállítására volt (Bakos, 1979). Az utóbbi években azonban egyre inkább előtérbe került a génbankban fenntartott fajták kutatása. Az állományon több stresszbiológiai, immunológiai és molekuláris genetikai vizsgálatot is elvégeztünk (Jeney és mtsai, 1995; Csizmadia és mtsai, 1995; Lehoczky és mtsai, 2005). Ezekre a kísérleti előzményekre alapozva 2006 elején egy kísérletsorozatba kezdtünk, amelynek célja különböző genetikai háttérű pontyvariánsok („családok”) előállítására, növekedési teljesítményük, *A. hydrophila*-val és Koi herpeszvírussal szembeni

ellenálló-képességük vizsgálata, illetve az ezekhez a tulajdonságokhoz köthető immunológiai, molekuláris genetikai és proteomikai markerek azonosítása volt. A munkát az Európai Unió által támogatott EUROCARP nevű kutatási projekt keretében végeztük, amelyben a HAKI-n kívül 6 külföldi intézet (3 brit, 2 orosz, 1 norvég) vett részt.

A kísérlethez olyan pontyfajtákat választottunk ki a génbankból, amelyek genetikai háttere ismert, tenyésztési története dokumentált volt, eléggé eltérő volt a genetikai hátterük és immunológiai potenciáljuk, továbbá a korábbi kísérletekből rendelkezésünkre álltak a genetikai és immunológiai paraméterekre vonatkozó előzetes adatok.

1. táblázat

A kísérlethez kiválasztott pontyfajták keresztezései és a létrehozott genetikai variánsok („családok”)

Tejes(1) Ikrás(2)	Dunai					Amuri					Tatai					15						
	N°	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Dunai	1	X							X									X				
	2	X							X									X				
	3		X									X								X		
	4		X									X								X		
	5			X									X									
	6			X									X									
	7						X								X							
	8						X								X							
	9							X									X					
	10							X									X					
Amuri	1				X		X															X
	2				X		X															X
	3					X								X		X						
	4					X								X		X						
	5	X														X						
	6	X														X						
	7									X		X										
	8									X		X										
	9										X											X
	10										X											X
Tatai	1		X							X										X		
	2		X							X										X		
	3			X									X									X
	4			X									X									X
	5				X									X								
	6				X									X								
	7							X							X							
	8							X							X							
	9								X								X					
	10									X							X					
15	1					X		X									X					
	2					X		X									X					
	3	X														X		X				
	4	X													X		X					
	5		X																			
	6		X																			
	7									X	X											
	8									X	X											
	9						X						X									X
	10						X						X									X

X: Két kiválasztott egyed keresztezése(3)

Table 1: Crosses of carp strains selected for the experiment and the created genetically different variants („families”)
Columns: males(1), rows: females(2), x: cross of two selected individuals(3)

Választásunk így 4 pontyfajtra esett: amuri pikkelyes (vadponty), dunai pikkelyes (vadponty), tatai pikkelyes (tenyésztett tájfajta) és szarvasi 15-ös tükrös (beltenyésztett vonal). A kiválasztott fajták tejeseit és ikráit minden lehetséges (4x4=16-féle) kombinációban egymáshoz kereszteztük. A kísérlet során törekedtünk a lehető legnagyobb genetikai változatosság biztosítására, ezért minden fajtából 5 tejest és 10 ikrást használtunk a keresztezésekhez és minden keresztezésből 6 családot állítottunk elő különböző tejesek és ikrások felhasználásával, ami összesen 96 (16x6) családot jelentett (1. táblázat).

Az utódokat 10 grammos méretig felneveltük, majd minden családból 100 (összesen 9600) halat egyedi elektronikus azonosítóval (PIT-taggel) láttunk el. A jelölt halakat 5 csoportra osztottuk. Az első csoporttal tógazdasági teljesítményvizsgálatot végeztünk, a másodikon fertőzési kísérletet végeztünk *A. hydrophilával*, a harmadikat a CEFAS (Central for Environmental, Fisheries and Aquaculture Sciences) inézetbe (Weymouth, Nagy-Britannia) küldtük a Koi herpeszvírussal elvégzendő fertőzési kísérletre, a maradék két csoportot későbbi immunológiai, molekuláris genetikai és proteomikai kísérletekre tartalékoltuk. Ebben a publikációban a második csoporttal elvégzett kísérletet és annak eredményeit ismertetjük.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A halak szaporítása és az ikrák keltetése

2006 májusában minden kiválasztott fajtából 6 tejest és 12 ikrást a HAKI iskolaföldi telepéről a recirkulációs halnevelő rendszerbe szállítottunk. A rendszerben a víz hőmérsékletét fokozatosan 22-23 °C-ra emeltük. A tejeseket és ikrásokat a szaporításig külön medencékben tartottuk. A hormonkezelések és az ivartermékek gyűjtése előtt a halakat literenként 40g norcaicumot és 10 ml adrenalin (Tonogént) tartalmazó altatóval (Matuk és Gulyás, 1987) elaltattuk. A szaporítás előtti napon az 1,8-3,0 kg testtömegű tejeseket 2 mg/kg, az 1,3-4,2 kg testtömegű ikrásokat pedig 0,5 mg/kg pontyhipofízissel kezeltük. 12 órával később a tejesektől egyenként spermát gyűjtöttünk, amelyet számozott műanyag poharakban 1-3 °C-on tartottunk másnap reggelig. Az ikrásokat ezzel egy időben 4,0 mg/kg pontyhipofízissel kezeltük, ivaranyilásukat a kezelés előtt bevarrtuk. A hipofízist minden esetben 0,65%-os konyhasóoldatban homogenizáltuk és oldottuk. 11-15 órával a második hormonkezelés után az ikrásoktól ikrát gyűjtöttünk, amelyet műanyag tálakban kevertünk össze az előző nap gyűjtött tejjel, majd 2-3 percig folyamatos keverés mellett termékenyítőoldatot (4 g NaCl + 3 g karbamid 1 liter vízben) adtunk az ivartermékekhez. A pontytenyésztésben általánosan alkalmazott gyakorlattól eltérően az ikrák ragadóságát nem vettük el, mivel ez az időigényes művelet 96 család esetében kivitelezhetetlen lett volna. Családonként kb. 2000 megtermékenyített ikrát függönynyagra ragasztottunk, amelyet 40 literes, vízzel feltöltött műanyag kádakba helyeztünk. Minden családot

külön kádban keltettünk. A kádakban az állandó 2-3 liter/perces vízfolyást és 21-23 °C-os vízhőmérsékletet tartottunk fenn. Az inkubációs idő alatt naponta egyszer 15 percig 100 ppm formalinnal kezeltük az ikrákat a gombás fertőzések ellen. Az ikrák a megtermékenyítéstől számított harmadik-negyedik napon kikeltek. A kelési arány minden esetben meghaladta a 90%-ot.

Ivadéknevelés

A keléstől számított 3. naptól kezdve az ivadékokat naponta négyszer frissen kelt *Artemia* naupliusszal etettük. Az ürüléket és más hulladékot naponta egyszer, az első etetés előtt eltávolítottuk a kádakból. A második héttől az ivadékokat naponta egyszer 20 percig 100 ppm formalinnal kezeltük a parazitás fertőzések megelőzésére. A harmadik héten az ivadékokat fokozatosan 0,3-0,5 mm szemcseméretű „Nutra 4.0” lazac starter tápra (Skretting, Hendrix SpA, Olaszország) szoktattuk.

A keléstől számított egy hónap múlva családonként kb. 1000 ivadékot helyeztünk át 250 literes műanyag kádakba. Az eddig alkalmazott *ad libitum* mennyiség helyett a napi takarmányadagot minden családnál az össztömeg 8%-ában határoztuk meg, és fokozatosan nagyobb szemcseméretű tápokra tértünk át. A parazitás fertőzések ellen a halakat alkalmanként 30 percig 0,5 ppm formalinnal kezeltük.

A halak jelölése egyedi elektronikus azonosítóval (PIT-tag)

2006 augusztusában a kb. 10 grammos egyéni tömegű halakból családonként 100 darabot egyedi elektronikus azonosítóval (PIT-taggel) láttunk el. A beültetés előtt a halakat a korábban ismertetett összetételű altatóval (Matuk és Gulyás, 1987) elaltattuk. Ezután a halak hasfalán, a hasúszók mögött szikével egy 2-3 mm-es bemetszést ejtettük, amelyen keresztül boncolócsipesszel helyeztük a PIT-taget a hasüregbe. A jelölés után a jeleket egy hordozható számítógéphez kapcsolt AEG ARE H5 típusú leolvasó-készülékkel beolvastuk egy Microsoft Excel adatbázisba, amelyben a jelekhez tartozó tízjegyű kódokat családok szerint rendeztük. Később a halakkal kapcsolatos összes információt (testtömeg, testhossz, csoport, elhullás ideje, stb.) ebben az adatbázisban rögzítettük. A jelölt halakat a bevezetőben ismertetett 5 csoportra osztottuk és csoportonként elkülönítve, 4000 literes műanyag kádakban tartottuk.

A halak fertőzése *Aeromonas hydrophila* baktériummal

A 2. csoport halain 2007 februárjában és áprilisában két fertőzési kísérletet végeztünk *A. hydrophilával*. Az elsőben (előkísérlet) családonként 5 halat fertőztünk. Ez a kísérlet elsősorban a kísérleti módszer tesztelésére és begyakorlására szolgált. A második kísérlet (főkísérlet) során családonként 15 halat fertőztünk, és ezzel a kísérlettel határoztuk meg az egyes családok *A. hydrophila* fertőzéssel szembeni ellenálló-képességét. A fertőzéshez az *A. hydrophila*

B2/12 jelű törzsét használtuk, amelyet eredetileg Bangladesben izoláltak. Előzetes kísérleteinkben ez a törzs bizonyult a leginkább virulensnek. A baktériumokat felhasználásig 4 °C-on, 15 ml-es műanyag csövekben, szilárd TSA (Tryptic Soy Agar, Sigma) táptalajon tartottuk. A fertőzés előtti napon a baktériumot 10 ml folyékony TSB (Tryptic Soy Broth, Sigma) tápoldatba oltottuk és 24 óráig inkubáltuk 28 °C-on. A folyadékkultúrát lecentrifugáltuk, a kiülepedett baktériumokat felszuszpendáltuk 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) oldatban, majd centrifugálással mostuk. A baktériumok koncentrációját a szuszpenzió 610 nm hullámhosszon mutatott fényelnyelése alapján az LD50 koncentrációra állítottuk be. Ez az a dózis, amely a kísérleti állatok 50%-ának elhullását okozza. Értékét előzetes kísérletek alapján 5×10^7 baktérium/ml-nek határoztuk meg, amely 0,35 optikai denzitásnak felel meg 610 nm-en. A szuszpenzióból 0,1 ml-t oltottunk a halak hasüregébe.

A mortalitás regisztrálása és a fertőzéssel szemben legérzékenyebb és legellenállóbb családok kiválasztása

Mindkét fertőzési kísérletben a fertőzést követően két héten át regisztráltuk az elhullást, az első három napon óránként, a többi napon kétóránként. Az elhullott halak jelét beolvastuk az adatbázisba, amelyben rögzítettük az egyes halak elhullásának idejét. A nappal elhullott halak hasüregéből szilárd táptalajra baktériumokat oltottunk annak igazolására, hogy a halak valóban a fertőzés következtében pusztultak el.

A mortalitási adatok alapján a projekt norvég résztvevője, az AKVAFORSK intézet választja ki a 10 legellenállóbb és a 10 legérzékenyebb családot a Gianola és Foulley (1983) által leírt küszöb-modell (threshold model) alapján. Az adatok elemzéséhez az ASREML statisztikai programcsomagot használják.

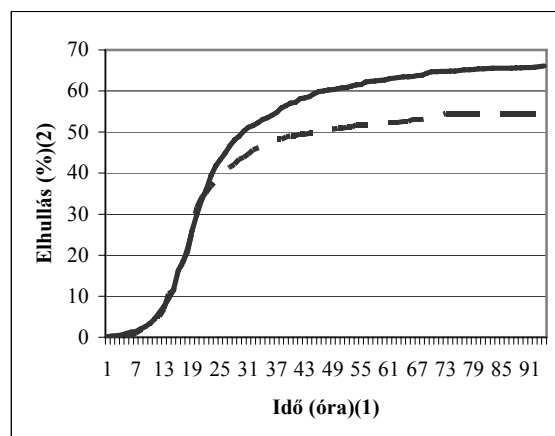
EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

A kísérlet során sikerült mesterséges szaporítással létrehozunk 96 különböző genetikai hátterű pontyvariánst, amelyek 2 vad és 2 tenyésztett

pontyfajta különböző egyedeinek keresztezéseiből származtak. A halakat a 10 grammos egyedi tömeg eléréséig recirkulációs halnevelő rendszerben neveltük. A jelölhető méretet elért halak közül családonként 100 példányt láttunk el egyedi elektronikus azonosítóval. A jelölt halak közül családonként 20-at fertőztünk *A. hydrophila* baktériummal.

Az *A. hydrophila* fertőzést követő kumulatív mortalitás az előkísérletben kb. 57%-os, a főkísérletben pedig kb. 68%-os volt (1. ábra).

1. ábra: Kumulatív mortalitás *Aeromonas hydrophila* fertőzés után



Szaggatott vonal: kumulatív mortalitás az előkísérletben(3)
Folytonos vonal: kumulatív mortalitás a főkísérletben(4)

Figure 1: Cumulative mortality following infection with *Aeromonas hydrophila*

Time after infection (hours)(1), mortality (percents)(2), dashed line: cumulative mortality in the preliminary experiment(3), continuous line: cumulative mortality in the main experiment(4)

Az elhullás 90%-a mindkét kísérletben a fertőzést követő 48 órán belül bekövetkezett. A mortalitási adatok feldolgozása és ezek alapján a 10 legellenállóbb és 10 legérzékenyebb család kiválasztása jelenleg is folyamatban van.

IRODALOM

- Bakos, J. (1979): Crossbreeding of Hungarian races of common carp to develop more productive hybrids. In: Pillay, T. V. R.-Dill, W. A. (eds.): Advances in Aquaculture. Fishing news Books Ltd., Farnham, Surrey, 633-635.
- Bakos, J.-Gorda, S. (2001): Genetic Resources of Common Carp at the Fish Culture Research Institute. FAO, Rome, 1-10. FAO Fisheries Technical Paper. No. 417, Szarvas, Hungary.
- Csizmadia, Cs.-Jeney, Zs.-Szerencsés, I.-Gorda, S. (1995): Transferrin polymorphism of some races in a live gene bank of common carp. Aquaculture 129. 193-198.
- Gianola, D.-Foulley, J. L. (1983): Sire evaluation for ordered categorical data with a threshold model. Genet. Sel. Evol. 15. 201.
- Gjedrem, T. (2000): Genetic improvement of coldwater fish species. Aquaculture research 31(1). 25-33.
- Jeney, Zs.-Jeney, G. (1995): Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture 129. 397-420.
- Jeney, Zs.-Papp, Zs.-Jeney, G.-Gorda, S. (1995): Stress sensitivity of four genetically different strains of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture 129. 203.
- Lehoczky, I.-Jeney, Zs.-Magyary, I.-Hancz, Cs.-Kohlmann, K. (2005): 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 247. 45-49.
- Matuk K.-Gulyás T. (1987): A halak altatásának újabb lehetőségei. Halászat 33. 11-13.

- Miyazaki, T.-Yo, J. (1985): A histopathological study of motile Aeromonad disease in ayu, *Plecoglossus altivelis*. Fish pathology 20, 55-60.
- Plumb, J. A. (1999): Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 328.
- Rahmann, M. H.-Kusuda, R.-Kawai, K. (1997): Virulence of starved *Aeromonas hydrophila* in cyprinid fish. Fish Pathology 32, 163-168.
- Trust, T. J.-Sparrow, R. A. (1974): The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. Can. J. Microbiol. 20(9). 1219-1228.
- Vandeputte, M. (2003): Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. Aquat. Living Resour. 16. 399-407.