

Szent István Egyetem

**Mikroszatellit markerek izolálása hal
populációk genetikai variabilitás vizsgálatának
és nemesítésének megalapozásához**

Doktori értekezés tézisei

Kánainé Sipos Dóra Ildikó

Gödöllő

2019

A doktori iskola megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állat biotechnológia, molekuláris genetika az állattenyésztésben

Vezetője: Dr. Mézes Miklós

tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Kovács Balázs

tudományos főmunkatárs

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK	5
CÉLKITŰZÉSEK	5
2. ANYAG ÉS MÓDSZER	7
2.1 MINTAGYŰJTÉS.....	7
2.2 DNS IZOLÁLÁS	8
2.3 KÖNYVTÁRKÉSZÍTÉS	8
2.4 SZEKVENCIA MEGHATÁROZÁS ÉS PRIMER TERVEZÉS	9
2.5 REAKCIÓKÖRÜLMÉNYEK OPTIMALIZÁLÁSA.....	9
2.6 MIKROSZATELLIT ANALÍZIS	10
2.7 POPULÁCIÓGENETIKAI-, VALAMINT MARKEREK-JELLEMZÉSHEZ ALKALMAZOTT SZOFTVEREK	11
2.8 A FEJLESZTETT MIKROSZATELLITEK PCR ALAPÚ KIMUTATÁSÁNAK MULTIPLAXÁLÁSA.....	12
3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	13
3.1 SÜLLŐ (<i>SANDER LUCIOPERCA</i>).....	13
3.1.1 Könyvtárkészítés és az újonnan fejlesztett markerek jellemzése	13
3.1.2 Populációgenetikai analízis	13
3.1.3 A multiplex PCR optimalizálás eredményei	16
3.2 SÜGÉR (<i>PERCA FLUVIATILIS</i>).....	16
3.2.1 Könyvtárkészítés és az újonnan fejlesztett markerek jellemzése	16
3.2.2 Populációgenetikai analízis	17
3.3 AFRIKAI HARCSA (<i>CLARIAS GARIEPINUS</i>).....	18
3.3.1 Könyvtárkészítés és az újonnan fejlesztett markerek jellemzése	18
4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	20
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	22
5.1 KÖNYVTÁRKÉSZÍTÉS	22
5.2 SÜLLŐ (<i>SANDER LUCIOPERCA</i>).....	23
5.3 SÜGÉR (<i>PERCA FLUVIATILIS</i>).....	25
5.4 AFRIKAI HARCSA (<i>CLARIAS GARIEPINUS</i>).....	27
6. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK	28
6.1 AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK ...	28
6.2 AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN TARTOTT ELŐADÁSOK	28
6.3 AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT POSZTER, ABSZTRAKT	29
6.4 KÖNYVFEJEZET.....	30
6.5 EGYÉB, NEM AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK.....	30

7. IRODALOMJEGYZÉK	32
---------------------------------	-----------

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A halhús fogyasztás mértéke világszerte növekszik. Ez részben köszönhető a folyamatosan gyarapodó népesség növekvő igényeinek, valamint annak, hogy a nyugati társadalmakban egyre többen választják az egészséges életmódhoz hozzátartozó halhús fogyasztást. Ezek közül is igen felértékelődött a ragadozó halak fogyasztása. A természetes halszaporulatból ezek a megnövekedett igények már nem kielégíthetőek. Annál is inkább, mert a fogások meglehetősen nagy ingadozásokat mutatnak, amely jelenség többek között az igen jelentős antropogén hatásokból (környezetszennyezés, élőhely degradáció, túlhalászat) ered. Bár az akvakultúra egy igen lendületes ágazata az agrárgazdaságnak, ahhoz, hogy a megnövekedett igények folyamatosan kielégíthetőek legyenek, szükségesek további tartástechnológiai fejlesztések és a technológiát jól tűrő változatok nemesítése. Mindemellett pedig szükséges az antropogén hatásoknak kitett természetes populációk rendszeres genetikai monitorozása, szükséges a genetikai variabilitás megőrzése, valamint a mesterséges populációk rendszeres „frissítése”. Mind a tenyésztett változatok nemesítéséhez, mind a populáció genetikai értékeinek megőrzéséhez szükséges az adott faj mélyreható genetikai ismerete. Ez lehetséges teljes genom vizsgálattal, ám ennek magas költsége miatt még jelenleg is széles körben elterjedt a polimorf genetikai markerek alkalmazása.

Célkitűzések

Munkánk során olyan ragadozó halfajok vizsgálatát tűztük ki célul, melyek Magyarországon is egyre jelentősebbek. Ezek közül az első a süllő (*Sander lucioperca*), mely hazánkban az egyik őshonos csúcsragadozó, igen keresett a sporthorgászok körében és a fogyasztók is igen kedvelik ízletes húzáért. Míg számos kutatócsoport foglalkozik a süllő produktum növelésével, addig a faj genetikai hátteréről hiányosak az információink, valamint kevés genetikai marker áll rendelkezésre az állományok mélyrehatóbb

tanulmányozásához. Ezért célul tűztük ki fajspecifikus mikroszatellit markerek fejlesztését, valamint a fejlesztett genetikai markerekkel a Duna vízgyűjtő területéről származó állományok genetikai diverzitás vizsgálatát, annál is inkább, mivel a Közép-Európai süllő populációk variabilitását eddig még nem monitorozták.

A süllővel egy családba (*Percidae*) sorolható sügér (*Perca fluviatilis*), szintén őshonos, egyre nagyobb népszerűségnek örvendő ragadozónk. Bár néhány fajspecifikus mikroszatellit már rendelkezésre áll a faj vizsgálatára, ez az eszköztár még nem elégséges a faj állományainak hatékony vizsgálatára. Ezért célul tűztük ki fajspecifikus mikroszatellitek izolálását, majd ezek felhasználásával meghatározni a magyar és lengyel állományok közötti genetikai differenciáltságot.

Végezetül a harmadik vizsgált faj az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*), amely bár nem őshonos hazánkban, mégis a második legnagyobb mennyiségben megtermelt halunk. Európában Hollandia és Olaszország is jelentős mennyiségben állítja elő, de Ázsiában és Közép Afrikában is igen kedvelt halfajnak számít. Ezeken a területeken intenzív rendszerben, valamint Afrikában tógazdasági körülmények között is, nevelik az afrikai harcsát. Ez a sok szempontból tág tűrésű faj számtalan biológiai kutatásnak is vizsgált objektuma. Mivel genetikai háttéréről igen csekély információ áll rendelkezésre, ezért célul tűztük ki, hogy minél nagyobb számban polimorf mikroszatellit markereket izoláljunk. Ezekkel a genetikai eszközökkel az is vizsgálható, hogy a mesterségesen szaporított és fenntartott állományok diverzitása milyen mértékben változik.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Mintagyűjtés

Süllő esetén összesen 376 egyedről (10 populáció), sügér esetén 182 (3 populáció), valamint afrikai harcsa esetén 32 egyedről vettünk farokúszó mintát. A 1. táblázat összegzi a begyűjtött minták származását, mintavételi helyét, mintaszámát, valamint hogy mely populációtípusból származnak. A begyűjtött farokúszó mintákat -20°C-on tömény etanolban tároltuk DNS izolálásig.

1. táblázat. Mintavételi helyek, populáció típusok és mintaszámok fajonként.

Faj	Ország	Mintavétel helye (Populáció jelölése)	Populáció típusa	Minta -szám
Süllő (<i>Sander lucioperca</i>)	Németország	Duna felső szakasza (Ge)	természetes vízi	14
	Magyarország	Kisbajcs (Kb)	intenzív recirkulációs rendszer	78
		Győr (Gy)	intenzív recirkulációs rendszer	21
		Balaton (Ba)	természetes vízi	60
		Dalmand (Da)	halgazdaság	46
		Attala (At)	halgazdaság	21
		Akasztó (Ak)	halgazdaság	21
		Nyíregyháza (Ny)	halgazdaság	47
	Románia	Temesvár (Ti)	intenzív recirkulációs rendszer	20
		Duna-delta torkolat (De)	természetes vízi	48
		Összesen:	376	
Sügér (<i>Perca fluviatilis</i>)	Magyarország	Biatorbágy (Hu-B)	halgazdaság	80
		Dunaföldvár (Hu-D)	halgazdaság	43
	Lengyelország	Olstyn (Po-O)	természetes	59
			Összesen:	182
Afrikai harcsa (<i>Clarias gariepinus</i>)	Magyarország	Szarvas és Gödöllő (Ma)	intenzív recirkulációs rendszer	22
	Hollandia	Wageningen (Ho)	intenzív recirkulációs rendszer	10
			Összesen:	32

2.2 DNS izolálás

A szövetmintákból fenol/kloroformos izolálási eljárással nyertük ki a DNS-t (Sambrook & Russell 2001). Az izolálást követően a DNS minőségét agaróz gél elektroforézissel (1% agaróz, 1x TBE-puffer, 0,5 µg/ml etídium-bromid) vizsgáltuk és koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg. Az így kapott DNS-t kettős céllal használtuk fel: 20 µg DNS-t a könyvtárkészítésre, valamint 50 ng/µl koncentrációra kihígítva a mikroszatellit analízishez.

2.3 Könyvtárkészítés

Glenn és Schable (2005) módosított módszerével CA-dinukleotid ismétlődésekben dúsított genomi könyvtárakat hoztunk létre. A könyvtárkészítéshez szükséges DNS-t hím egyedekből nyertük, mivel a vizsgált halfajokban a hímek a heterogamétások, (Rougeot et al. 2002; Galbusera et al. 2000) amelyek így mindkét ivari kromoszómát hordozzák. A süllő esetén a könyvtár készítéshez a hím egyedek a Dalmandi populációból származtak, sügér esetén pedig a dunaföldvári állományból kerültek ki, míg afrikai harcsa esetén a könyvtárkészítéshez szükséges hím egyedek Szarvasról származtak. A 20 µg genomi DNS-t tompa végeket adó restriktív enzimekkel hasítottuk (*Hae III* / *Alu I* / *Rsa I*, / *HpyCH4 V*). Agaróz gél (2% agaróz, 0,5 µg/ml etídium-bromid, 1x TBE-puffer) elválasztás után, a gélből a 300-1000 bp méretű DNS-szakaszokat izoláltuk vissza NucleoSpin Extract II kit segítségével a gyártó ajánlásai alapján. A fragment mennyiségét spektrofotométer segítségével határoztuk meg, majd 10 µg fragmentre foszfátáz kezelést követően BoxI linkert ligáltunk. A BoxI linkerhez használt oligonukleotidok szekvenciája: BoxI forward primer: 5'-Phos-ATG TCT GAA GGT ACC ACT GCT GTC CGA AA-3'; BoxI reverse primer: 5'-CGG ACA GCA GTG GTA CCT TCA GAC AT-3'. A linkert képző oligonukleotidok összeolvasztását Thermal Cycler készülékben végeztük. Az így elkészített adapter kapcsolását 16°C-on egy éjszakán át végeztük. A reakcióelegyhez BoxI restriktív enzimet is mértünk, hogy a linker-

linker komplexeket el tudjuk hasítani. A linker kapcsolódását a linkerről induló PCR reakcióval igazoltuk. Ezt követte a dúsítás, azaz a tandem repeat tartalmú DNS-szakaszok összegyűjtése. A fragmenteket 3' biotinilált, (CA)₁₀ ismétlődést hordozó oligonukleotiddal hibridizáltattuk. A kiemelt egyszálú DNS fragmenteket PCR segítségével alakítottuk kétszálúvá, a linker-specifikus primerek felhasználásával. Az így kapott terméket T-vektorba ligáltuk, majd XL10 GOLD *Escherichia coli* kompetens sejtbe transzformáltuk. A telepeket kék-fehér szelekció alapján szűrtük (Ullmann et al. 1967). Az inszertek méretét a T-vektoron kódolt M13 primerkötő helyekről induló kolónia PCR reakciót követő agaróz gél elektroforézissel (1.5%, 1x TBE puffer) ellenőriztük.

2.4 Szekvencia meghatározás és primer tervezés

A kolónia PCR reakció kiértékelését követően azokat termékeket tisztítottuk meg PCR Advanced Clean Up System segítségével, amelyek >300 bp méretükkel jelezték a vektorba épülést. A tisztított PCR termékekről SP6- (5' CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG 3'), valamint T7- (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') primereket alkalmazva 3.1-es BigDye kittel kapilláris gélelektroforézissel meghatároztuk az inszertek bázissorrendjét. A szekvenciákat MEGA5 szoftverrel értékeltük (Tamura et al. 2011). A legalább 5 dinukleotid tandem ismétlődést tartalmazó szekvenciák flanking régióira Primer3Plus szoftverrel specifikus primereket terveztünk (Rozen & Skaletsky 2000; Untergasser et al. 2007), majd meghatároztuk működési körülményüket (a markerek kimutatására alkalmazott PCR-reakció összetételét és optimális hőmérsékleti profilját).

2.5 Reakciókörülmények optimalizálása

A mikroszatellit markerek kimutatása polimeráz láncreakcióval történt. A reakciókörülmények optimalizálása során pontosan meghatároztuk a reakció összetételét és hőmérsékleti profilját. A reakciót 25 µl végtérfogatban végeztük. 1x Taq-polimeráz puffer

(KCl vagy $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tartalmú), 0,132 mM-0,264 mM forward és reverse primer, 1,5-3,00 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTP, 0,04 U/ μl Taq-polimeráz és 150 ng templát DNS. A reakció hőprofilja: 2 percig 95°C-on, majd 2x $-(95^\circ\text{C}$ 15 másodperc, $52-56^\circ\text{C}$ 1 perc, 72°C 2 perc), ezt követően 35 / 45x $-(95^\circ\text{C}$ 15 másodperc, $52-56^\circ\text{C}$ 20 másodperc, 72°C 40 másodperc), végül 72°C -on 5 perc. A következő markerek kimutatásához DMSO (4 térfogat%) hozzáadása is javasolt: *MS 350 Cg*, *MS 432 Pf*, *MS 441 Pf*, *MS 455 Pf*, *MS 716 Pf*. Az amplikon 5' végére – a bázispár pontosságú méret-meghatározásához – fluoreszcens jelölést építettük be. Ezt a következő módokon végeztük: A) esetben a PCR reakcióban alkalmazott forward primerek hordoztak 5' FAM fluoreszcens jelölést (direkt jelölt primer), B) esetben a forward primert hosszabbítottuk meg egy 17 bp hosszúságú, a vizsgált fajra nem specifikus szakasszal (tail; 5'-ATT ACC GCG GCT GG-3'), amellyel komplementer egy harmadik, 5' végén fluoreszcens festékkel (PET, FAM, VIC vagy NED) jelölt primer (tail primer) (Shimizu et al. 2002). A PCR reakció során az amplikonok végére épül a jelölést hordozó oligonukleotid.

2.6 Mikroszatellit analízis

Mindhárom faj esetén az optimalizált reakciók lehetővé tették, hogy a markerek működőképességének ellenőrzéséhez és marker jellemzéshez alacsonyabb mintaszámon (8-8 egyed), majd populációgenetikai vizsgálathoz magasabb mintaszámon végezzük el a PCR reakciókat. Süllő esetén 10 populáció populációgenetikai diverzitás becslését végeztük el, összesen 376 egyed. Sügér esetén 2 magyar állomány és 1 lengyel populáció genetikai összehasonlító analízisét valósítottuk meg, összesen 182 egyeddel. Az afrikai harcsa mikroszatellit alapú genetikai jellemzését 32 egyeddel végeztük el. A reakciók sikerességét 2,5-3 % agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük, majd a sikeres reakciókat előkészítettük fragmentanalízisre, mely vizsgálatot 3130 Genetic Analyzer segítségével végeztük el. A fragmentanalízis nyers adatai alapján a

bázispár pontosságú fragment méreteket GENEMAPPER SOFTWARE VER. 4.0 szoftver segítségével olvastuk le, az értékeket MS EXCEL programmal készítettük elő a populációgenetikai számításokhoz.

2.7 Populációgenetikai-, valamint markerek-jellemzéshez alkalmazott szoftverek

A fragmentanalízissel megállapított allélméret szolgál alapul a populációgenetikai mutatók számításához. Meghatároztuk a populációnkénti várt (H_E) és a megfigyelt (H_o) heterozigotizációs értékeket, valamint a lókuszonkénti PIC-értéket (Polimorf Információs Tartalom) az EXCEL MICROSATELLITE TOOLKIT VER. 3.1.1 (Park 2001) segítségével. F_{STAT} VER. 2.9.3.2 (Goudet 1995) programmal számoltunk a markerek allélgazdagságát (A_r), a populációk F_{IS} -értékeit (a genetikai variancia populáción belüli komponense), valamint az F_{ST} -értéket (a genetikai variancia populációk közötti komponense), továbbá a géndiverzitást és az összállélszámot lókuszonként és populációnként. A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést GENPOP VER. 4.1.0 (Rousset 2008) programmal állapítottuk meg. A populációnkénti és lókuszonkénti átlagos allélszámot, az átlagos géndiverzitást, valamint a populációpáronkénti F_{ST} értékeket az ARLEQUIN VER. 3.5 (Excoffier et al. 2005) szoftverrel számoltuk. Az egyedi allélok meghatározását, valamint a PCoA (Principal Coordinate) analízist a GENALEX VER. 6.502 (Peakall & Smouse 2012; Smouse et al. 2015) programmal végeztük el. A Nei-féle genetikai távolság (Nei et al. 1983) meghatározásához a POPULATIONS VER. 1.2.32 (Langella 2002), valamint a törzsfá szerkesztéshez süllyő esetén a FIGTREE VER. 1.3.1 (Rambaut 2009), süllyő esetén a MEGA7 VER. 7.0.14 (Kumar et al. 2016) szoftvereket alkalmaztuk. Az egyedek mikroszatellit analízis eredménye alapján a vizsgált állomány szerkezetét (populációs információk felhasználása nélkül) a STRUCTURE VER. 2.3.3 (Hubisz et al. 2009; Pritchard et al. 2000) programmal állapítottuk meg. A legvalószínűbb genetikai klaszter számát az egyes K -értékek

valószínűségi analízise alapján határoztuk meg ($L'(K)$, $L''(K)$ és ΔK) STRUCTURE HARVESTER (Evanno et al. 2005; Earl & vonHoldt 2012) segítségével. A populációgenetikai analízisben alkalmazott markerek estén GENETIX. VER. 4.05.2 (Belkhir et al. 1999) szoftverrel vizsgáltuk a kiegyensúlyozatlan kapcsoltságot (LD: linkage disequilibrium). A null-allél jelenlétének, az allél kiesésnek, továbbá a genotipizálási hibáknak a valószínűségét MICRO-CHECKER VER. 2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004) szoftverrel állapítottuk meg. MICROSOFT EXCEL program segítségével kerestük, hogy van-e kapcsolat az ivar és a genotípus között azaz, hogy vajon valamely marker ivarhoz köthető-e (süllő és sügér vizsgálatokban). Az effektív populációméretet LDNE VER. 1.31 szoftverrel határoztuk meg (Waples & Do 2008).

2.8 A fejlesztett mikroszatellitek PCR alapú kimutatásának multiplexálása

A kimutatás módszerét tovább fejlesztettük abból a célból, hogy csökkentjük az analízis (PCR alapú kimutatás és fragmentanalízis) idő- és a felhasznált anyagok költségét, valamint a laboratóriumi munkát. Ezért az újonnan izolált süllő mikroszatellitekből kiválasztottunk 16, magas allélszámmal rendelkező markert, amelyek a reakciókörülményeket (PCR összetétel és hőprofil) illetően megegyeznek. Kialakítottunk 4 különböző marker-szettet, szettenként 4, allélméretük tekintetében jól elkülönülő mikroszatellittel. Szettenként eltérő fluoreszcens jelölést alkalmaztunk (PET, NED, FAM, VIC), így a fragmentanalízis előkészítésekor az azonos egyedből származó minták együttesen vizsgálhatóak (a minták „pool”-ozhatóak). A fragmentek méretét GeneScan 500 LIZ molekulaszúly markerekhez viszonyítva 3130 Genetic Analyzer segítségével határoztuk meg.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1 Süllő (*Sander lucioperca*)

3.1.1 Könyvtárkészítés és az újonnan fejlesztett markerek jellemzése

A süllő genomi DNS-éből kétféle restriktív enzim használatával (*Rsa I*, *HpyCH4 V*) két CA-dinukleotid ismétlődésekben dúsított könyvtárat hoztunk létre. A meghatározott szekvenciákat génbank (NCBI GenBank) adatbázisba helyeztük. Ezek közül 34 esetben sikerült működőképes markert fejlesztenünk. A markerek működőképességét legalább 8 egyedden teszteltük, majd jellemzőit meghatároztuk. A 34 működőképes marker mind polimorfnak bizonyult, a detektált allélok száma 3-20 között alakultak lokuszonként. A legtöbb allélt (20) az *MS 260 Sl* markerrel tudtuk detektálni, de magas a polimorfitás az *MS 84 Sl*, *MS 192 Sl*, *MS 412 Sl*, valamint az *MS 424 Sl* markereknek is.

3.1.2 Populációgenetikai analízis

A kifejlesztett markerek közül 7 markert (*MS 192 Sl*, *MS 195 Sl*, *MS 198 Sl*, *MS 203 Sl*, *MS 260 Sl*, *MS 268 Sl*, *MS 397 Sl*) alkalmaztunk 10, a Duna vízgyűjtő területéről származó természetes és mesterségesen (tógazdaságban és recirkulációs rendszerben) fenntartott állomány (Ak: Akasztó; At: Attala; Gy: Győr; Ti: Temesvár; Kb: Kisbajcs; Ny: Nyíregyháza; Da: Dalmand; Ba: Balaton; De: Duna-delta torkolat; Ge: Duna felső szakasza) diverzitás vizsgálatára. A kiválasztott markerek közül a legtöbb különböző allélt (17; 20), a legmagasabb átlagos allélszámot (7; 6,7) és allélgazdagságot (10,226; 8,661) az *MS 192 Sl*, valamint az *MS 260 Sl* markerekkel detektáltuk, azonban az átlagos összallélszám (9,14) is magas volt. A legmagasabb átlagos allélszámmal meglepő módon a mesterségesen kialakított kisbajcsi (Kb: 5,43) és dalmandi (Da: 4,71) állományok rendelkeznek.

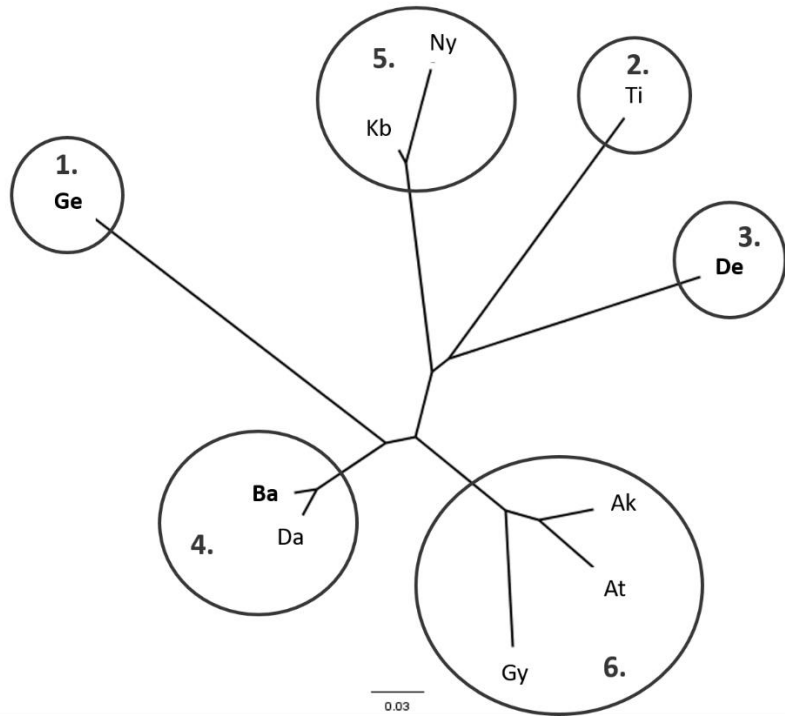
A várt (H_E) heterozigotitás értékek 0,452-0,593 között, a megfigyelt (H_o) heterozigotitás értékek 0,415-0,567 között alakultak.

Csupán a temesvári (Ti) és a német (Ge) csoportokon belül áll fenn a Hardy-Weinberg egyensúly. A legmagasabb átlagos géndiverzitás a Duna-Delta torkolati (De) és az attalai (At) populációknál figyelhető meg. A populációk többségénél kismértékű heterozigóta-hiány figyelhető meg, de a kisbajcsi (Kb) állománynál kismértékű heterozigóta-többlet van ($F_{IS} = -0,038$).

A populációk vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált csoportok hordoznak egyedi jellegzetességeket is. A legtöbb (4) egyedi allélt a Duna-delta torkolatából (De) származó csoportnál észleltünk, de a kisbajcsi (Kb) és a győri (Gy) állományok is hordoznak 3-3 egyedi allélt. Az *MS 260 Sl* marker 9 egyedi alléllal rendelkezik, a soron következő *MS 397 Sl* marker már csupán 3-mal. Az egyedi alléloknek a frekvenciája igen alacsony, azonban az *MS 260 Sl* marker esetén az egyedi allélok előfordulásának gyakorisága 15% a németországi populációban (Ge).

Az összes vizsgált populációra az F_{ST} -érték 0,214, mely azt tükrözi, hogy a populációk közötti genetikai differenciáltság meglehetősen magas.

Meghatároztuk a Nei-féle genetikai távolságot (Nei-féle D_a), és a kapott eredmény alapján a populációk közötti rokonság ábrázolására filogenetikai fát (Neighbour Joining) készítettünk (1. ábra). A legnagyobb genetikai távolságot ($D_a=0,807$) a német (Ge) és a győri (Gy) populációk között tapasztaltuk. Továbbá nagy genetikai távolságot mértünk a temesvári (Ti) és a német ($D_a=0,758$), a kisbajcsi (Kb) és a német ($D_a=0,778$), valamint a Duna-Delta torkolati (De) és a német ($D_a=0,713$) populációpárok között. A legkisebb genetikai távolságot a dalmandi-balatoni populációpárnál ($D_a=0,040$) figyeltünk meg, de hasonlóan alacsony értékeket mutatnak az akasztói-attalai ($D_a=0,073$) és a kisbajcsi-nyíregyházi ($D_a=0,085$) populációpárok.



1. ábra. Nei-féle genetikai távolság alapján készített dendrogram Neighbour Joining módszer alapján.

A német (Ge, az ábrán 1. számmal jelölve), a temesvári (Ti, 2. számmal jelölve) és a Duna-delta torkolati (De, 3. számmal jelölve) elkülönülő származási csoportokat alkotnak, míg a balatoni (Ba)-dalmandi (Da) populációk egy származási csoportba (4. számmal jelölve) tartoznak; a kisbajcsi (Kb) és nyíregyházi (Ny) állományok szintén külön származási egységet alkotnak (5. számmal jelölve); valamint az akasztói (Ak)-attalai (At)-győri (Gy) állományok is egy származási csoportot alkotnak (6. számmal jelölve). A félkövérrel jelölt populációk a természetes vízi populációk (Ge, Ba, De).

A genetikai távolság alapján PCoA (Principal Coordinate Analysis vagy fő-koordináta elemzés) elemzést is végeztünk a GENALEX szoftver segítségével, továbbá STRUCTURE VER. 2.3.3 szoftver segítségével meghatároztuk az állományok genetikai szerkezetét különböző számú klaszterek jelenlétét feltételezve. A STRUCTURE HARVESTER programcsomag Evanno-módszere a legvalószínűbb csoportszámnak a $K=6$ mutatta, azaz a 10 mintavételi helyről származó minták genetikailag 6 külön csoportba sorolhatók be. A

populációgenetikai analízisben alkalmazott markerek között nem tapasztaltunk kiegyensúlyozatlan kapcsoltságot (linkage disequilibrium). Azt is vizsgáltuk, hogy a detektált allélok kapcsoltságban állnak-e az ivarral, de ebben a tekintetben nem találtunk összefüggést, ugyanis nem találtunk olyan allélt egyik fejlesztett marker esetén sem, amely csak az egyik ivarban mutatkozott volna meg.

3.1.3 A multiplex PCR optimalizálás eredményei

Az újonnan fejlesztett süllő markerek közül 16 olyan markert választottunk ki, melyek kellően magas polimorfitásúak, azonos reakciókörülmények szükségesek a kimutatásukhoz, valamint 4 különálló szettbe csoportosíthatóak az amplifikált termékek hossza alapján. Az optimalizált reakciók működőképességét 4 tesztesyeden ellenőriztük. Ezzel a módszerrel közel negyedére csökkentettük a felhasznált anyagok mennyiségét, valamint a laboratóriumi munka időigényét, összességében pedig egy költséghatékony módszert fejlesztettünk ki. Egy populációgenetikai analízisben rendszerint elégséges 10-12 polimorf mikroszatellit alkalmazása, ez a módszer igen hatékony és gyors megoldást nyújt nagy mintaszámú vizsgálat esetén.

3.2 Sügér (*Perca fluviatilis*)

3.2.1 Könyvtárkészítés és az újonnan fejlesztett markerek jellemzése

A könyvtárkészítés során 2-féle restriktív enzimet (*Rsa I*, *HpyCH4 V*) alkalmaztunk az izolált DNS hasításához és CA₁₀ oligonukleotiddal hoztunk létre a dúsított könyvtárakat. Az általunk meghatározott szekvenciákat GenBank adatbázisba helyeztük. Összesen 25 esetben sikerült működőképes markert fejlesztenünk. A markerek optimális működési körülményeit meghatároztuk, majd minimum 8 kiválasztott egyeden teszteltük és jellemeztük.

A 25 működőképes marker mind polimorfnak bizonyult, a detektált allélok száma 3-48 között alakultak. A legtöbb allélt (48) az

MS 428 Pf markerrel tudtuk detektálni, de magas a polimorfítása az *MS 427 Pf*, *MS 464 Pf*, valamint az *MS 726 Pf* markereknek is.

3.2.2 Populációgenetikai analízis

Az újonnan fejlesztett markerek közül az előzetes vizsgálatok alapján választott 12 markerrel (*MS 426 Pf*, *MS 427 Pf*, *MS 428 Pf*, *MS 439 Pf*, *MS 464 Pf*, *MS 467 Pf*, *MS 500 Pf*, *MS 719 Pf*, *MS 725 Pf*, *MS 726 Pf*, *MS 732 Pf*, *MS 739 Pf*) populációgenetikai analízist végeztük 2 hazai (Hu-D: Dunaföldvár, Hu-B: Biatorbágy) tógazdasági állományon összehasonlítva egy lengyelországi (Po-O: Olsztyn) természetes sügér populációval. A legmagasabb átlagos allélszámmal a lengyelországi természetes populáció (Po-O) rendelkezik. Mindhárom populációra elmondható, hogy a heterozigotitás alacsony (heterozigóta hiányt tapasztaltunk), mind szignifikánsan eltérnek a Hardy-Weinberg-féle egyensúlyi állapottól. Összességében viszont a populációk közötti genetikai differenciáltság jelentős ($F_{ST}=0,247$).

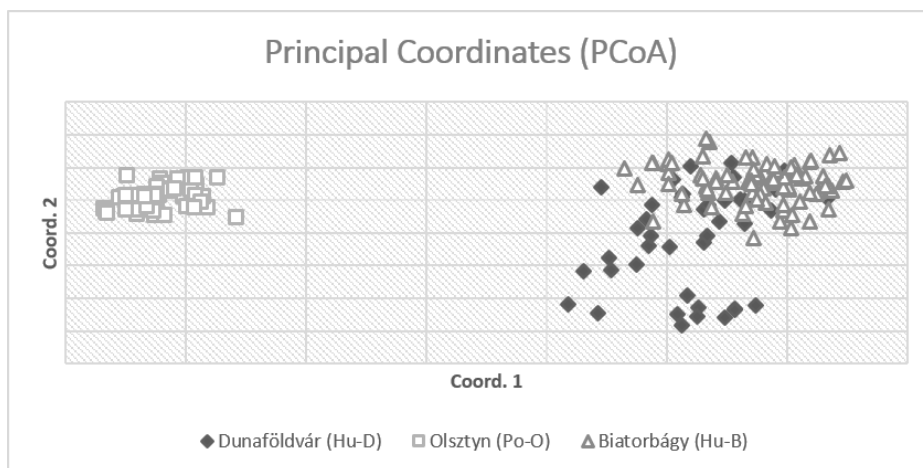
Kerestük az egyes populációk egyedi jellegzetességeit az egyedi allélok detektálásával. A Hu-B populáció kimagaslóan sok egyedi allélt (16) hordoz az *MS 428 Pf* marker esetén, de még ennél is nagyobb mértékű a Po-O populáció egyedisége, amelynél 21 egyedi allélt találtunk az *MS 427 Pf* marker analízisével, továbbá 18 egyedi allélt az *MS 726 Pf* markerrel, 14 egyedi allélt az *MS 464 Pf* markerrel, valamint 10 egyedi allélt az *MS 725 Pf* mikroszatellittel.

A populációkat páronként is összevetettük, a Nei-féle genetikai távolság (D_a), továbbá az F_{ST} értékek függvényében. A Nei-féle genetikai távolság egészen kicsi (0,149) a 2 magyar állomány között (ahogyan a földrajzi távolság is), azonban jóval nagyobb a 2 magyar és a lengyel állományok ($>0,6$) között. A genetikai differenciáltságot mutató F_{ST} értékek alapján is ugyanerre a következtetésre jutottunk.

A populációk szerkezetét STRUCTURE analízissel határoztuk meg. A legvalószínűbb csoportszám $K=2$, azaz a 3, különböző helyről származó populáció genetikailag - az alkalmazott 12 polimorf mikroszatellit markerrel végzett analízis alapján - 2 külön csoportba

sorolható be. Az egyik csoportot a 2 magyarországi mesterséges állomány alkotja (Hu-D és Hu-B), a másikat a természetes lengyel populáció (Po-O).

A GENALEX szoftverrel számolt genetikai távolság alapján meghatározott PCoA (Principal Coordinate Analysis) analízis eredményét a 2. ábra mutatja be. Az ábra jól tükrözi a magyar állományok hasonlóságát és a lengyel populáció genetikai elkülönülését.



2. ábra. A GENALEX szoftverrel számolt genetikai távolság alapján meghatározott PCoA (Principal Coordinate) analízis eredménye.

Hu-D: Dunaföldvár, Po-O: Olsztyn, Hu-B: Biatorbágy.

A populációgenetikai analízisben alkalmazott markerek között csupán az *MS 428 Pf* és az *MS 439 Pf* markerek között tapasztaltunk kiegyensúlyozatlan kapcsoltságot. Mivel az *MS 439 Pf* marker egyébként is alacsony polimorfitású, a későbbi analízisekből ennek a markernek az alkalmazása mellőzhető. Vizsgáltuk a markerek és az ivar kapcsoltságának lehetőségét is, azonban egyik lókuszt sem mutatott ivari kapcsoltságot egyik állományban sem.

3.3 Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*)

3.3.1 Könyvtárkészítés és az újonnan fejlesztett markerek jellemzése

Összesen 4 különböző CA-ismétlődéssel dúsított genomi könyvtárat hoztunk létre (*Hae III / Rsa I / Alu I / HpyCH4V* restriktációs

enzimek használatával). Ezekből összesen 55 esetben tudunk a kimutatásukhoz PCR primereket tervezni és működésük körülményeit optimalizálni. Az 55 mikroszatellit marker közül 49 működőképességét összesen 32 egyedben teszteltük, melynek célja a markerek működőképességének meghatározása, valamint jellemzése volt. Ennek a vizsgálatnak az eredménye alapján kiválasztottuk a 8 leginkább polimorf egyedet, és a maradék 6 mikroszatellit ezeken az egyedeken teszteltük és ezek alapján jellemeztük.

A markerenként detektált allélok száma 2-11 között alakultak, de a markerek több, mint fele (27 db) 5-6 allélt reprezentált és 7 rendelkezett nagyobb allél számmal. Az átlagos összallélszám 5,12. A legalacsonyabb várt heterozigotitás (H_E) 0,117 (*MS 668 Cg*), a legmagasabb 0,793 (*MS 175 Cg*), a minimum és maximális megfigyelt heterozigotitás értékek (H_O) 0,031 (*MS 663 Cg*) – 1,000 (*MS 3 Cg*, *MS 305 Cg*) között változtak. A várt és megfigyelt heterozigotitás értékek közötti különbség közel a markerek felénél (22 marker) nem szignifikáns, azonban sok olyan markereknél (22 marker), ahol szignifikáns a különbség, ott ez a differencia igen jelentős ($P < 0,001^{***}$). Meghatároztuk a markerek PIC (Polymorphic Information Content) értékeit, az allélgazdagságukat (A_r), valamint a géndiverzitásukat. A legmagasabb mutatókkal az *MS 175 Cg* (PIC: 0,763; A_r : 10,024; géndiverzitás: 0,804) marker, a legalacsonyabbakkal az *MS 308 Cg* és az *MS 668 Cg* markerek rendelkeznek (ezek megegyeznek: PIC: 0,110; A_r : 1,875; géndiverzitás: 0,125).

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Elvégzett munkám alapján a következő új tudományos eredményeket értem el:

1. Süllő (*Sander lucioperca*) fajból 34 új, működőképes, polimorf mikroszatellit markert izoláltam, melyeknek PCR-alapú kimutatásának reakciókörülményeit meghatároztam.

2. A süllőből izolált markerek közül 7-tel (*MS 192 Sl, MS 195 Sl, MS 198 Sl, MS 203 Sl, MS 260 Sl, MS 268 Sl, MS 397 Sl*) a Duna vízgyűjtő területéről származó 10 populáció diverzitás becslését elvégeztem. Kimutattam, hogy a vizsgált populációk többsége szignifikánsan eltér Hardy-Weinberg egyensúlyi állapottól, továbbá meghatároztam a vizsgált állományok egymáshoz viszonyított populációs szerkezetét és genetikai származási kapcsolatait.

3. A süllőből izolált markerek közül 16-ot multiplex PCR analízisbe vontam négy - egyenként négy markert magába foglaló - szett kialakításával. Meghatároztam a multiplex PCR optimális reakciókörülményeit, mellyel közel negyedére csökkentettem az analízis munka- és a felhasznált anyagok mennyiségét, így a vizsgálat költségét is.

4. Sügér (*Perca fluviatilis*) fajból 25 új, polimorf mikroszatellit markert izoláltam, melyeknek PCR-alapú kimutatásának reakciókörülményeit meghatároztam.

5. A sügérből izolált markerek közül 12 marker (*MS 426 Pf, MS 427 Pf, MS 428 Pf, MS 439 Pf, MS 464 Pf, MS 467 Pf, MS 500 Pf, MS 719 Pf, MS 725 Pf, MS 726 Pf, MS 732 Pf, MS 739 Pf*) alkalmazásával 2 magyar és egy lengyel állomány között összehasonlító populációgenetikai analízist végeztem. Kimutattam, hogy a vizsgált populációk szignifikánsan eltérnek a Hardy-Weinberg egyensúlyi állapottól, továbbá meghatároztam a vizsgált populációk egymáshoz viszonyított populációs szerkezetét.

6. Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) fajból 55 új, működőképes, polimorf mikroszatellit markert izoláltam, melyeknek PCR-alapú kimutatásának reakciókörülményeit meghatároztam.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1 Könyvtárkészítés

A dúsítás módszere (azaz a mikroszatellit tartalmú DNS fragmentek összegyűjtése) igen hatékonynak bizonyult, a tradicionális izolálási módszerekkel összevetve (Rassmann et al. 1991; Lunt et al. 1999), továbbá hasonló hatékonyságú dúsítást értünk el más dúsítással bővített mikroszatellit izolálási módszerekhez viszonyítva (Ostrander et al. 1992; Kandpal et al. 1994).

Annak ellenére, hogy a dúsítás igen nagy hatékonyságú volt, a detektált markereket nem tudtunk mind markerré alakítani, ugyanis gyakran tapasztaltuk azt, hogy a flanking régiók alkalmatlanok primertervezésre: vagy túl rövidek, vagy valamilyen rövid ismétlődő szekvenciát hordoznak, vagy éppen túl magas/túl alacsony a GC-tartalmuk.

Összehasonlítva az új generációs szekvenáláson alapuló mikroszatellit és SNP marker izolálással, a dúsítás esetén a polimorfizmust tartalmazó szekvenciák száma ugyan két nagyságrenddel kevesebb, a költsége azonban az újgenerációs szekvenálások árának csökkenése ellenére is jóval alacsonyabb. A kivitelezéshez szükséges eszközrendszer nem tartalmaz speciális műszereket és nagy értékű gépeket (kivételesen a kapilláris elektroforézis készülék). A könyvtárkészítés jóval egyszerűbb és kisebb munkaigényű, míg a primer tervezés és a markerek tesztelése ugyanolyan mértékű munkát és költséget jelent. Ráadásul a mikroszatellit markerek jóval polimorfabbak, mint az SNP markerek, emiatt mintegy háromszor kevesebb marker vizsgálatára van szükség a konzerváció biológiai és populációgenetikai munkák során. Megfelelően kialakított és jellemzett marker szett esetén pedig a kiértékelés automatizálása is megoldható (Vignal et al. 2002; Helyar et al. 2011).

5.2 Süllő (*Sander lucioperca*)

Jelenleg a süllő populációkról továbbra is csekély genetikai információ áll rendelkezésre, csak néhány tanulmány jelent meg (Kohlmann & Kersten 2008; Gharibkhani et al. 2009; Khurshut & Kohlmann 2009; Han et al. 2016) annak ellenére, hogy e faj egyre jelentősebb szerepet kap az intenzív rendszerű haltermelésben.

A fejlesztett markerek mind polimorfnek bizonyultak, a magasabb polimorfítással és allélgazdagsággal rendelkező markereket javasoljuk további vizsgálatokban való felhasználásra, akár közeli rokon fajok esetében is (mint például *MS 84 Sl*, *MS 192 Sl*, *MS 260 Sl*, *MS 412 Sl*, *MS 424 Sl*).

Az új markerek közül 7 markerrel (*MS 192 Sl*, *MS 195 Sl*, *MS 198 Sl*, *MS 203 Sl*, *MS 260 Sl*, *MS 268 Sl*, *MS 397 Sl*) tíz, a Duna vízgyűjtő területről származó populáció és tenyészállomány genetikai variabilitását, szerkezetét és genetikai rokonságát vizsgáltuk. Kerestük az egyre fokozódó süllő telepítés, intenzív és tógazdasági termelés populációkra gyakorolt hatását, amelynek egyik jele, hogy a markerek többségénél, valamint a populációk összességét tekintve a várt és megfigyelt heterozigotizáció értékek között szignifikáns különbség mutatkozott, kismértékű heterozigóta-hiányt tapasztaltunk ($F_{IS} = 0,039$). Feltételezhetően ez részben a túlhalászat, részben pedig a mesterséges szaporításoknál alkalmazott alacsony egyedszám következménye lehet. A heterozigotizációt hosszú évtizedes, több generációs munkával jól átgondolt betelepítésekkel lehetne emelni.

A mikroszatellit markerrel végzett populációgenetikai analízisből kiderül, hogy a 10 populáció jelentős genetikai különbözőséget ($F_{ST} = 0,214$) mutat, de páronként vizsgálva találtunk olyanokat, amelyek ennél is jelentősebb mértékben különböznek egymástól, mint például a német (Ge) populációtól jelentősen különböznek a győri (Gy), a kisbajcsi (Kb), a nyíregyházi (Ny) és a temesvári (Ti) állományok. Az összes populációtól leginkább a németországi Felső-Duna szakasz (Ge) populációja különbözik el, itt az egyedi allélok frekvenciája is

magasabb a többi populációhoz képest. A legnagyobb genetikai diverzitást a kisbajcsi (Kb) intenzív rendszer mutatta, ami nagy valószínűséggel annak köszönhető, hogy a mintavételt megelőzően többször frissítették az anyaállományt külső forrásból származó anyákkal.

Ezt támasztja alá a populációk genetikai távolsága alapján készült törzsfa is, amelyen a vad populációk egymáshoz viszonyítva a földrajzi elhelyezkedésüknek megfelelően találhatók meg (vagyis a balatoni állomány a dendrogram két szélén elhelyezkedő duna-deltai (De) és a felső dunai (Ge) állomány között található). Azonban a tógazdasági és intenzív rendszerekben tenyésztett állományok nem illeszthetők be ebbe a rendszerbe és jól kirajzolódik, hogy mely állományok kialakítása épül ugyanarra a genetikai bázisra. A populációk genetikai struktúrájának vizsgálata ezzel teljesen megegyező eredményre vezetett, amely szerint a 10 populáció legnagyobb valószínűséggel 6 csoportra tagolódik. A dalmádi (Da) populációt balatoni (Ba) anyahalak révén, a győri (Gy) állományt az akasztói (Ak), valamint az attalai (At) halgazdaságokból, továbbá a kisbajcsi (Kb) intenzív rendszer állományát a nyíregyházi (Ny) halgazdaságból származó halak révén hozták létre.

Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy süllő esetén az elmúlt tíz évben bekövetkezett tartástechnológiai fejlesztések (Policar et al. 2016) és tenyésztési programok (Lappalainen et al. 2016) még nem gyakoroltak jelentős hatást a természetes vízi süllő állományokra, bár a túlzott halászatnak és visszatelepítéseknek köszönhetően megfigyelhető némi eltérés a Hardy-Weinberg egyensúlyban. Az egyre intenzívebb tenyésztés, a szelekciós programok és visszatelepítések azonban a faj genetikai bázisának jelentős degradációjához, az elkülönült változatok eltűnéséhez és a genetikai háttér felhígulásához, uniformizálódáshoz vezethet, úgy mint például a régóta tenyésztésbe vont ponty (Hulak et al. 2010), vagy sebes pisztráng (Ward 2006) esetén. Mindezt felismerve aktuálissá vált a génmegőrzési munka elindítása, a faj genetikai értékeinek megőrzése

érdekében. Ehhez igen nagy segítséget nyújthat a költségek csökkentése érdekében fejlesztett multiplex PCR alkalmazása, mellyel 16 mikroszatellit lókuszt tudunk vizsgálni.

5.3 Sügér (*Perca fluviatilis*)

Az elmúlt közel 20 év során számos tanulmány jelent meg természetes sügér populációk és tenyésztett állományok genetikai diverzitásáról, valamint az antropogén hatások monitorozásáról. A tanulmányok többsége Ny-Európában (Khadher et al. 2016) és É-Európában (Olsson et al. 2011) élő állományokat vizsgál, továbbá egyetlen tanulmány ázsiai sügér állományokkal foglalkozik (Yang et al. 2012), azonban közép-európai természetes és mesterséges körülmények között tartott sügér-közösségeit eddig még nem vizsgálták genetikai markerekkel. Ezeknek a tanulmányoknak nagyobb hányadát *Sander vitreus*-ból és *Perca falvecens*-ből, a *Percidae* család amerikai kontinensen élő, rokon fajaiból izolált mikroszatellitekkel végezték. Azonban a közeloakon fajokból izolált mikroszatellitek nem minden esetben alkalmazhatóak, sőt, gyakran alacsonyabb polimorfítást mutatnak más fajokban (Yue et al. 2010). Elsőként Yang és munkatársai (2009), később Pukk és munkatársai (2014) izoláltak mikroszatelliteket *P. fluviatilis*-ből. Jelen tanulmányban ezt a munkásságot kívánjuk folytatni, újabb, fajspecifikus mikroszatellit markerek fejlesztésével, növelve az így létrehozott genetikai eszközt, valamint ezek felhasználásával elsőként monitoroztuk közép-európai állományok genetikai differenciáltságát.

Az alkalmazott könyvtárkészítés hatékonysága közel optimális, mivel a vizsgált inszertek, több mint 92% egyedi szekvenciát hordozott, mindemellett a dúsítás is igen hatékonynak bizonyult, ugyanis a kapott szekvenciák 93%-ban hordoztak mikroszatellitekre jellemző ismétlődő régiót.

A fejlesztett markerekről elmondható, hogy közülük néhányan kimagaslóan nagy polimorfitásúak (*MS 428 Pf*, *MS 427 Pf*, *MS 464 Pf*, *MS 726 Pf*), amelyek használata kifejezetten ajánlott további analízisek során, azonban az *MS 439 Pf* marker a magyar állományok vizsgálatában monomorfnek bizonyult, a továbbiakban ez a marker mellőzhető az analízisekből.

A vizsgált állományok szignifikánsan eltérnek a Hardy-Weinberg egyensúlytól. Ez a magyar mesterségesen kialakított állományok és a lengyel populáció esetében is feltehetően a szaporítások és a szelekció antropogén hatásának következménye. A mikroszatellitek átlagos allélszáma ennek ellenére viszonylag magasnak mutatkozott (9,611). A Nei-féle genetikai távolságok, a populációpáronkénti F_{ST} értékek, valamint a STRUCTURE és GENALEX szoftverekkel végzett analízisek alapján elmondhatjuk, hogy az egymástól kisebb földrajzi távolságra levő dunaföldvári (Hu-D) és biatorbágyi (Hu-B) állományok genetikailag rendkívül hasonlóak egymáshoz, genetikai szempontból egy csoportot alkotnak, míg a lengyel sügér genetikai szempontból elkülönülő csoportot alkot. Ezt az elkülönülést a kimagaslóan sok egyedi allél jelenléte is alátámasztja.

Munkánk során olyan új genetikai eszközrendszert fejlesztettünk, amely önmagában is, valamint a korábban leírt genetikai markerek mellé is, jól alkalmazhatóak genetikai variabilitás megállapítására sügér populációkban, valamint feltehetőleg a *Percidae* család más képviselőiben is. Az általunk alkalmazott módszer jól alkalmazható lehet olyan közeli fajok esetében is, amelyek esetén még egyáltalán nem izoláltak nagy polimorfitású genetikai markereket, vagy a jelenlegi eszköztár még további bővítésre szorul. Munkánk egyedülálló abból a szempontból, hogy ez a tanulmány foglalkozik először mikroszatellit alapú vizsgálattal a közép-európai sügér állományok esetén.

5.4 Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*)

Az afrikai harcsából eddig mindösszesen 18 mikroszatellit markert írtak le (Galbusera et al. 1996; Volckaert & Hellemans 1999, Yue et al. unpublished data), munkánk során ezt a genetikai eszközt további 55 új polimorf markerrel bővítettük ki. Míg az afrikai kontinensen természetes körülmények között megtalálható a faj – így a termelését befolyásolja a természetes fogásokból származó mennyiségek, addig Ázsiában és Európában előállított mennyiség teljes egésze intenzív recirkulációs rendszerekből származik, ami azt is magával hozza, hogy az állományok genetikai szempontból jelentős változáson mehetnek keresztül. Az állományok genetikai sokfélesége lecsökkenhet erősen beltenyésztett populációkat létrehozva (ezeken a területeken nem állnak rendelkezésre természetes állományok a genetikai variabilitás növeléséhez). A genetikai markerekkel meghatározva a genetikai sokféleséget, ezt a leromlást igazolhatjuk vagy cáfolhatjuk, valamint genetikai markereket alkalmazva olyan egyedek bevonásával végezhetjük a szaporításokat, amik még kellően polimorfak, így az állomány genetikai sokfélesége növelhető.

6. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

6.1 Az értekezés témakörében megjelent tudományos publikációk

Kánainé Sipos Dóra, Bakos Katalin, Urbányi Béla, Kovács Balázs (2010): Genetikai marker fejlesztése ragadozó halfajok vizsgálatához. XVI. ITF, 2010. március 25., Keszthely (ISBN: 978-963-9639-36-2)

Dóra Kánainé Sipos, Gyula Kovács, Eszter Buza, Katalin Csenki-Bakos, Ágnes Ósz, Uros Ljubobratović, Réka Cserveni-Szücs, Miklós Bercsenyi, István Lehoczky, Béla Urbányi, Balázs Kovács (2019) Comparative genetic analysis of natural and farmed populations of pike-perch (*Sander lucioperca*) Aquaculture International: 1-17. DOI: 10.1007/s10499-019-00365-7.

Dóra Kánainé Sipos, Katalin Bakos, Ágnes Ósz, Árpád Hegyi, Tamás Müller, Béla Urbányi, Balázs Kovács (2019) Development and characterization of 49 novel microsatellite markers in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Molecular Biology Reports <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05062-5>

6.2 Az értekezés témájában tartott előadások

Kánainé Sipos Dóra; Bakos Katalin; Müller Tamás; Urbányi Béla; Kovács Balázs (2011) Mikroszatellit markerek fejlesztése ragadozó halak vizsgálatához. Előadás a „Doktoranduszok Kaposvári Workshopja” című rendezvényen, 2011. jún. 8. Kaposvár

Kánainé Sipos Dóra, Bakos Katalin, Müller Tamás, Urbányi Béla, Kovács Balázs: Ragadozó halfajok genetikai variabilitás vizsgálatának megalapozása „III. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok”, konferencia előadás, 2011. október 14-15.

Kánainé Sipos Dóra, Bakos Katalin, Szücs Réka, Bercsenyi Miklós, Urbányi Béla, Kovács Balázs (2012): A süllő (*Sander lucioperca*) populációgenetikai vizsgálata mikroszatellit markerekkel. Előadás a XXXVI. Halászati Tudományos Tanácskozáson. 2012. május 23-24, Szarvas

Dora Kanaine Sipos, Katalin Bakos, Reka Szucs, Tamas Muller, Miklos Bercsenyi, Bela Urbanyi, Balazs Kovacs (2012): A population genetic study of the pike-perch (*Sander lucioperca* L.) with new

microsatellite markers. Oral presentation on “AQUA 2012”. 1-5th September, 2012, Prague, Czech Republic

6.3 Az értekezés témájában megjelent poszter, absztrakt

Kánainé Sipos Dóra, Bakos Katalin, Urbányi Béla, Kovács Balázs (2010): Genetikai markerek növekvő jelentőségű ragadozó halfajokból. Poszter a XXXIV. Halászati Tudományos Tanácskozás-on, 2010. május 12-13., Szarvas

Kánainé Sipos Dóra (2010): Ragadozó halfajok genetikai vizsgálatának megalapozása. Poszter a Kárpát-medencei Doktoranduszok Nemzetközi Konferenciája-n (TUDOC), 2010. május 27-28., Gödöllő

Kánainé S. D., K. Bakos, T. Müller, B. Urbányi, B. Kovács (2010): Microsatellite marker isolation from carnivorous fishes Poster on Aquaculture Europe 2010, 5-8th October 2010, Porto, Portugalia

Kánainé Sipos Dóra, Bakos Katalin, Bősze Bernadett, Müller Tamás, Urbányi Béla, Kovács Balázs (2011) Mikroszatellit markerek ragadozó halak vizsgálatához. Poszter a XXXV. Halászati Tudományos Tanácskozás-on, 2011. május 25-26., Szarvas (abstract: p.:38.)

S. D. Kánainé, K. Bakos, T. Müller, B. Urbányi, B. Kovács: Microsatellite markers for newly cultured carnivorous fish in Hungary. Poster on the Genomics in Aquaculture 2011 International Symposium 14th-17th September 2011, Heraklion, Crete, Greece

D. Kánainé Sipos, K. Bakos, T. Müller, B. Urbányi, B. Kovács (2012): Isolation new, specific genetic markers from the African catfish (*Clarias gariepinus*), pike-perch (*Sander lucioperca*) and perch (*Perca fluviatilis*). Poster on 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award. 22-25th March, 2012, Szeged, Hungary

Dóra Kánainé Sipos, Katalin Bakos, Réka Szücs, Tamás Müller, Miklós Bercsényi, Béla Urbányi, Balázs Kovács (2012): New microsatellite markers and population genetic studies of carnivorous fishes. Poster presentation on Domestication in Finfish Aquaculture 23-25th October, 2012, Olsztyn, Poland

Dóra Kánainé Sipos, Uri Csilla, Katalin Bakos, Ágnes Ósz, Máté Péli, Daniel Źarski, Zoltán Bokor, Lászlo Kotrik, István Ittész, Béla Urbányi, Balázs Kovács: Marker development and population genetic studies of perch (*Perca fluviatilis*). Poster presentation on

Diversification In Inland Finfish Aquaculture II 24-26th September, 2013, Vodňany, Czech Republic p.82.

Kánainé S. Dóra, Guti Csaba, Keszte Szilvia, Lehoczky István, Balogh Réka, Urbányi Béla, Kovács Balázs (2017) Süllő (*Sander lucioperca*) mikroszatellit markerek alkalmazásának tovább fejlesztése: idő- és költséghatékonyság növelése. Poszter a XLI. Halászati Tudományos Tanácskozáson (2017. június 14-15, Szarvas).

Kánainé S. Dóra, Guti Csaba, Keszte Szilvia, Lehoczky István, Balogh Réka, Urbányi Béla, Kovács Balázs (2017) Új multiplex mikroszatellit vizsgálati szett *Sander lucioperca* állományok genetikai analíziséhez. Poszter a VI. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap konferencián. (2017. november 24, Gödöllő).

6.4 Könyvfejezet

Kovács Balázs, Bakos Katalin és Kánainé Sipos Dóra: A harcsafajok molekuláris biológiája és genetikája. In: Horváth László, Urbányi Béla és Horváth Ákos (szerk.) A harcsa (*Silurus glanis*) biológiája és tenyésztése. Gödöllő: Szent István Egyetemi Kiadó, 2011. pp 61-78. (ISBN: 978-963-269-266-1)

Kovács Balázs, Bakos Katalin és Kánainé Sipos Dóra A süllő genetikája. In: Horváth László, Urbányi Béla és Horváth Ákos (szerk.) A süllő (*Sander lucioperca*) biológiája és tenyésztése (Második, átdolgozott kiadás). Sztárstúdió Bt., 2013. pp 55-62. (ISBN: 978-963-269-353-8)

6.5 Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent tudományos publikációk

Katalin Bakos, Róbert Kovács, Ádám Staszny, Dóra Kánainé Sipos, Béla Urbány, Ferenc Müller, Zsolt Csenki, Balázs Kovács (2013): Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*). AQUATIC TOXICOLOGY (136–137):13–21.

Ákos Horváth, György Hoitsy, Balázs Kovács, Dóra Kánainé Sipos, Ágnes Ősz, Béla Urbányi, Klavdija Bogataj, Aleš Snoj (2014): The effect of domestication on a brown trout (*Salmo trutta m fario*) broodstock in Hungary. AQUACULTURE INTERNATIONAL 22:(1) pp. 5-11.

Béres B, Kánainé Sipos D, Müller T, Staszny Á, Farkas M, Bakos K, Orbán L, Urbányi B, Kovács B (2017) Species-specific markers

provide molecular genetic inland waters evidence for natural introgression of bullhead catfishes in Hungary PEERJ 5: Paper e2804. 17 p. (2017)

Ágnes Ősz, Ákos Horváth, György Hoitsy, Dóra Kánainé Sipos, Szilvia Keszte, Anna Júlia Sáfrány, Saša Marić, Csaba Palkó, Balázs Tóth, Béla Urbányi and Balázs Kovács (2018) The genetic status of the Hungarian brown trout populations: exploration of a blind spot on the European map of *Salmo trutta* studies. PeerJ 6:e5152; DOI 10.7717/peerj.5152.

Keszte Szilvia, Kánainé Sipos Dóra, Stein Renáta, Mészáros Orsolya, Balogh Erna, Zellei Ágnes, Sebestyén András, Balogh Réka, Guti Csaba Ferenc, Bokor Zoltán, Urbányi Béla, Kovács Balázs (2018) A velencei-tavi vadponty tájfajta Kajászói Tógazdaságban fenntartott anyajelölt állományának genetikai diverzitás vizsgálata. Halászat-Tudomány 4(1): 3-9 (2018) HU ISSN 0133-1922.

Bakos, Katalin; Kovács, Róbert; Balogh, Erna; Sipos, Dóra Kánainé; Reining, Marta; Gyömörei-Neuberger, Orsolya; Balázs, Adrienn; Kriszt, Balázs; Bencsik, Dóra; Csepeli, Andrea; Gazsi, Gyöngyi; Hadzhiev, Yavor; Urbányi, Béla; Müller, Ferenc; Kovács, Balázs, Csenki, Zsolt (2019). Estrogen sensitive liver transgenic zebrafish (*Danio rerio*) line (Tg(vtg1:mCherry)) suitable for the direct detection of estrogenicity in environmental samples AQUATIC TOXICOLOGY 208 pp. 157-167., 11 p.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Belkhir, K.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N. and Bonhomme, F. 1999. 'GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations'. <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>.
- Earl, D.A. and vonHoldt, B.M. 2012. 'STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method', *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-61.
- Evanno, G.; Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. 'Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE : a simulation study', *Molecular Ecology*, 14: 2611-20.
- Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S. 2005. 'Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis', *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Galbusera, P.; Volckaert, F.A.; Hellemans, B. and Ollevier, F. 1996. 'Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)', *Molecular Ecology*, 5: 703-05.
- Galbusera, P.; Volckaert, F.A.M. and Ollevier, F. 2000. 'Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation', *Aquaculture*, 185: 25-42.
- Gharibkhani, M.; Pourkazemi, M.; Soltani, M.; Rezvani, S. and Azizzadeh, L. 2009. 'Population genetic structure of Pikeperch (*Sander lucioperca* Linnaeus, 1758) in the Southwest Caspian Sea using microsatellite markers', *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4: 161-68.
- Glenn, T.C. and Schable, N.A. 2005. 'Isolating Microsatellite DNA Loci', *Methods in Enzymology*, 395: 202-22.
- Goudet, J. 1995. 'FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics', *Journal of Heredity*, 86: 485-86.
- Han, X.; Ling, Q.; Li, C.; Wang, G.; Xu, Z. and Lu, G. 2016. 'Characterization of pikeperch (*Sander lucioperca*) transcriptome and development of SSR markers', *Biochemical Systematics and Ecology*, 66: 188-95.
- Helyar, S.J.; Hemmer-Hansen, J.; Bekkevold, D.; Taylor, M.I.; Ogden, R.; Limborg, M.T.; Cariani, A.; Maes, G.E.; Diopere, E.; Carvalho, G.R. and Nielsen, E.E. 2011. 'Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges', *Molecular Ecology Resources*, 11: 123-36.
- Hubisz, M.; Falush, D.; Stephens, M. and Pritchard, J. 2009. 'Inferring weak population structure with the assistance of sample group information', *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322-32.
- Hulak, M.; Kaspar, V.; Kohlmann, K.; Coward, K.; Tešitel, J.; Rodina, M.; Gelam, D.; Kocour, M. and Linhart, O. 2010. 'Microsatellite-based

- genetic diversity and differentiation of foreign common carp (*Cyprinus carpio*) strains farmed in the Czech Republic', *Aquaculture*, 298: 194-201.
- Kandpal, R.P.; Kandpal, G. and Weissman, S.M. 1994. 'Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 88-92.
- Khadher, S.B.; Fontaine, P.; Milla, S.; Agnès, J.-F. and Teletchea, F. 2016. 'Genetic characterization and relatedness of wild and farmed Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): Possible implications for aquaculture practices', *Aquaculture Reports*, 3: 136-46.
- Khurshut, E. and Kohlmann, K. 2009. 'Application of nine species-specific microsatellite loci to characterize three pike-perch (*Sander lucioperca*) populations from the Aral Sea basin in Uzbekistan', *Environmental Biotechnology*, 5: 3-10.
- Kohlmann, K. and Kersten, P. 2008. 'Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the pike-perch, *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758)', *Molecular Ecology Resources*, 8: 1085-87.
- Kumar, S.; Stecher, G. and Tamura, K. 2016. 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-74.
- Langella, O. 2002. 'Populations 1.2.30'.
<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>.
- Lappalainen, A.; Saks, L.; Sustar, M.; Heikinheimo, O.; Jürgens, K.; Kokkonen, E.; Kurkilahti, M.; Verliin, A. and Vetemaa, M. 2016. 'Length at maturity as a potential indicator of fishing pressure effects on coastal pikeperch (*Sander lucioperca*) stocks in the northern Baltic Sea', *Fisheries Research*, 174: 47-57.
- Lunt, D.H.; Hutchinson, W.F. and Carvalho, G.R. 1999. 'An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA)', *Molecular Ecology*, 8: 891-94.
- Nei, M.; Tajima, F. and Tateno, Y. 1983. 'Accuracy of Estimated Phylogenetic Trees from Molecular Data II. Gene Frequency Data', *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153-70.
- Olsson, J.; Mo, K.; Florin, A.-B.; Aho, T. and Ryman, N. 2011. 'Genetic population structure of perch *Perca fluviatilis* along the Swedish coast of the Baltic Sea', *Journal of Fish Biology*, 79: 122-37.
- Ostrander, E.A.; Jong, P.M.; Rine, J. and Duyk, G. 1992. 'Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 3419-23.
- Park, S.D.E. 2001. 'Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection', University of Dublin.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2012. 'GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update', *Bioinformatics*, 28: 2537-39.

- Policar, T.; Blecha, M.; Kristan, J.; Mraz, J.; Velisek, J.; Stara, A.; Stejskal, V.; Malinovskiy, O.; Svacina, P. and Samarin, A.M. 2016. 'Comparison of production efficiency and quality of differently cultured pikeperch (*Sander lucioperca* L.) juveniles as a valuable product for ongrowing culture', *Aquaculture International*, 24: 1607-26.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. 'Inference of population structure using multilocus genotype data', *Genetics*, 155: 945-59.
- Pukk, L.; Kisand, V.; Ahmad, F.; Gross, R. and Vasemagi, A. 2014. 'Double-restriction-site-associated DNA (dRAD) approach for fast microsatellite marker development in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.)', *Conservation Genetics Resource*, 6: 183-84.
- Rambaut, A. 2009. 'FigTree, version 1.3.1.'. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rassmann, K.; Schlotterer, C. and Tautz, D. 1991. 'Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA-fingerprinting', *Electrophoresis*, 12: 113-18.
- Rougeot, C.; Jacobs, B.; Kestemont, P. and Melard, Ch. 2002. 'Sex control and sex determinism study in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders', *Aquaculture*, 211: 81-89.
- Rousset, F. 2008. 'Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux', *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-06.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. 2000. 'Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.' in S. and Krawetz Misener, S.A. (ed.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Humana Press: Totowa, New Jersey).
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor: New York).
- Shimizu, M.; Kosaka, N.; Shimada, T.; Nagahata, T.; Iwasaki, H.; Nagai, H.; Shiba, T. and Emi, M. 2002. 'Universal Fluorescent Labeling (UFL) Method for Automated Microsatellite Analysis', *DNA Research*, 9: 173-78.
- Smouse, P.E.; Whitehead, M.R. and Peakall, R. 2015. 'An informational diversity framework, illustrated with sexually deceptive orchids in early stages of speciation', *Molecular Ecology Resources*, 15: 1375-84.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S. 2011. 'Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods', *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-39.
- Ullmann, A.; Jacob, F. and Monod, J. 1967. 'Characterization by *in vitro* Complementation of a Peptide corresponding to an Operator-proximal Segment of the β -Galactosidase Structural Gene of *Escherichia coli*', *Journal of Molecular Biology*, 24: 339-43.

- Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R. and Leunissen, J.A.M. 2007. 'Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3', *Nucleic Acids Research*, 35: 71-74.
- van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M. and Shipley, P. 2004. 'MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data', *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-38.
- Vignal, A.; Milan, D.; SanCristobal, M. and Eggen, A. 2002. 'A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics', *Genetics Selection Evolution*, 34: 275-305.
- Volckaert, F.A.M. and Hellemans, B. 1999. 'Survival, growth and selection in a communally reared multifactorial cross of African catfish (*Clarias gariepinus*)', *Aquaculture*, 171: 49-64.
- Waples, R.S. and Do, C. 2008. 'LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium', *Molecular Ecology Resources*, 8: 753-56.
- Ward, R.D. 2006. 'The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes', *Fisheries Research*, 80: 9-18.
- Yang, X.; Qian, L.; Wu, H.; Fan, Z. and Wang, C. 2012. 'Population differentiation, bottleneck and selection of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) at the Asian edge of its natural range', *Biochemical Systematics and Ecology*, 40: 6-12.
- Yang, X.; Wang, C.; Wang, J.; Ma, Y.; Yin, J. and Wu, H. 2009. 'Isolation and characterization of 12 polymorphic microsatellite loci in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.)', *Conservation Genetics Resources*, 1: 229-31.
- Yue, G.H.; Kovács, B. and Orbán, L. 2010. 'A New Problem with Cross-Species Amplification of Microsatellites: Generation of Non-Homologous Products', *Zoological Research*, 31: 131-40.