

Szent István Egyetem

**A magyarországi törpeharcsák (*Ameiurus spp.*) vizsgálata
morfológiai bélyegek, valamint molekuláris genetikai
módszerek segítségével**

Doktori (PhD) értekezés

Szabóné Béres Beatrix

Gödöllő

2018

A Doktori Iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztési-tudományok

vezetője: Dr. habil. Mézes Miklós,
a Magyar Tudományos Akadémia rendes tagja,
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem; Mezőgazdaság – és
Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet,
Takarmányozástani Tanszék

témavezetők: Dr. Urbányi Béla, D.Sc.
a Magyar Tudományos Akadémia doktora, tanszékvezető
egyetemi tanár
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

Dr. Kovács Balázs, Ph.D.
Tudományos főmunkatárs
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezetők jóváhagyása

1. TARTALOMJEGYZÉK

2.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
3.	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	7
4.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
4.1	A törpeharcsafélék (<i>Ictaluridae</i>) családjának bemutatása	9
4.1.1	Az Európába behurcolt <i>Ameiurus</i> fajok jellemzése	11
4.2	Az <i>Ameiurus</i> fajok európai elterjedése	13
4.2.1	A sárga törpeharcsa elterjedése	14
4.2.2	A barna törpeharcsa elterjedése	14
4.2.3	A fekete törpeharcsa elterjedése	15
4.2.4	A fajok magyarországi megjelenése	16
4.3	Fajmeghatározási módszerek halaknál	18
4.3.1	PCR elvi alapjai	20
4.3.2	A leggyakoribb PCR-alapú, fajazonosításban alkalmazott technikák	22
4.4	A törpeharcsa fajok morfológiai azonosítása	27
4.5	A törpeharcsa fajok genetikai azonosítása	30
5.	ANYAG ÉS MÓDSZER	31
5.1	A vizsgálatok helyszíne	31
5.2	A kísérletekben felhasznált minták	31
5.2.1	A Magyarországon gyűjtött minták	31
5.2.2	Az észak-amerikai kontinensről származó minták	33
5.2.3	Magyar múzeumi minták	34
5.3	Morfológiai vizsgálatok	34
5.4	DNS-kinyerés, tárolás	35
5.4.1	DNS-preparálás sós kicsapós módszerrel	36
5.4.2	DNS-izolálás fenol-kloroformos eljárással	36
5.4.3	DNS-izolálás formalin fixált múzeumi mintákból	37
5.5	A fajspecifikus genetikai markerek azonosítása	38
5.6	Multiplex PCR-reakció a fajok azonosításához	40

5.7	Mitokondriális DNS-analízis	41
5.8	PCR-termékek szekvencia meghatározása	42
5.9	Az eredmények statisztikai elemzése.....	43
5.10	Etikai nyilatkozat	43
6.	EREDMÉNYEK	44
6.1	Új fajspecifikus genomikai DNS-markerek azonosítása és jellemzése az <i>A. melasból</i> és az <i>A. nebulosusból</i>	44
6.2	Az <i>A.melas</i> , az <i>A.nebulosus</i> és hibridjeik azonosítására szolgáló PCR-alapú marker-teszt kidolgozása	46
6.3	A magyar törpeharcsák elterjedésének és hibridizációjának vizsgálata multiplex genomikai teszttel és mitokondriális genotípusokkal	47
6.4	A törpeharcsák COI mitokondriális szekvenciaanalízise	48
6.5	A múzeumi példányok genetikai vizsgálata	50
6.6	A morfológiai vizsgálatok eredménye.....	50
6.7	A fenotípusos adatok genotípus-alapú értékelése.....	55
7.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	58
8.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	61
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	62
10.	SUMMARY	64
11.	MELLÉKLETEK	66
	M1.IRODALOMJEGYZÉK	66
	M2. táblázat: A magyarországi mintavételi területekről gyűjtött törpeharcsa egyedek morfológiai bélyegeinek felvétele.....	84
	M3. táblázat: Élőhelyenkénti fenotípus és genotípus összehasonlítása, valamint az egyik legfontosabb határozóbélyeg, az úszósugárszámok összesítő adatai és az ivarösszesítés	99
	M4. táblázat: Genotípusok szekvenálás után az egyes mintavételi helyeken.....	101
	M5. táblázat: Az amerikai minták szekvencia-vizsgálata	102
	M6. táblázat: A magyarországi élőhelyekről származó törpeharcsák szekvencia-vizsgálata	104
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	109

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABI: Applied Biosystems

AFLP: Amplifikált Fragment Hossz Polimorfizmus (Amplified Fragment Length Polymorphism)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool - A szekvenciák azonosítását és összehasonlítását végző online program

bp: bázispár

BSA: szarvasmarha-szérum albumin (bovine serum albumin)

COI: citokróm oxidáz I gén (Cytochrome oxydase I gene)

CytB: citokróm oxidáz B gén (Cytochrome oxydase B gene)

DGGE: denaturáló gradiens gélelektroforézis

DNS: dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid)

EDTA: Etilén-diamin-tetraecetsav (ethylenediamine tetraacetic acid)

kb: kilobázispár

KÖRET: Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont

Lamda PSTI: molekulásúly marker

mtDNS: mitokondriális DNS (mitochondrial DNA)

MN: Minnesota állam (USA)

NÉBIH: Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

PCA: főkomponens-analízis (Principal Component Analysis)

PCR: Polimeráz láncreakció (Polymerase chain reaction)

PCR-RFLP: restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus

prot K: proteináz K enzim, a szövetemésztéshez szükséges enzim, mely a DNS, RNS preparáláshoz szükséges

QIA Quick Gel Extraction Kit (Qiagen): Fragment izoláció kit

RAPD: random amplifikált polimorf DNA

RNase A: Ribonukleáz A enzim, mely az RNS emésztéséhez szükséges

rpm: rotation per minutes - fordulatszám

SDS: nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulphate)

SET puffer: 20% szacharóz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl pH 8.0

SNP: egyszerű nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)

SSCP: egyszálú konformációs polimorfizmus (Single Strand Conformation Polymorphism)

UV: ultraibolya fény

TAIL puffer: 8%-os SDS, TRIS, EDTA, NaCl és milli q víz keveréke

Taq polimeráz: *Thermus acvaticus*-ból izolált hőstabil DNS polimeráz enzim

3. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A törpeharcsák (*Ameiurus spp.*, angol megfelelője: bullhead catfish) hazánkban igen elterjedt, de nem őshonos lakói vizeinknek. Az ember tudatos, de gyakran nem kellően átgondolt telepítő munkája következtében az elmúlt évszázadban eredeti élőhelyéről sokfelé széthurcolták. Eredeti előfordulási területe Észak-Amerika keleti része (JENKINS és BURKHEAD 1994), Kanadától egészen a Mexikói öböl, de az Egyesült Államok középső területein is sokfelé megtalálható.

Terjesztése – mint tógazdasági tenyésztésre alkalmas halfajé – egyrészt nyugatra, Idaho államba és Kaliforniába, másrészt a dél-amerikai, ázsiai és európai kontinens felé történt. Földrészünkön francia és német díszhaltenyésztők akváriumaiiban tűntek fel az első példányok 1880-ban. Széles körű elterjesztésük 1885-ben kezdődött, és Max Born (PINTÉR 1976) nevéhez fűződik, aki magas áron kínálta a tógazdáknak az új "csodahalat". A honosítás olyan jól sikerült, hogy néhány évtized alatt a törpeharcsa eljutott a Brit-szigetek kivételével Európa szinte valamennyi országába (PINTÉR 1976).

A törpeharcsa húsa szátkátlan, ízletes, viszonylag könnyen konyhakész állapotba hozható. Az eredeti élőhelyén a jó növekedési erélye miatt ígéretes, gazdaságilag fontos hálnak tartották, hazánkban azonban, de még Európában sem érte el a tőle elvárt célt. Ennek ellenére robosztus teste, impozáns, arányos megjelenése tette lehetővé az édesvízi díszakváriumokban való elterjedését.

A természet jó alkalmazkodó képességgel és erős védelemmel látta el, így válhatott uralkodó fajjává egyes ökoszisztémákban. Kimerevedő mell- és hátúszótüskéjének kulcs szerepe van a faj dominanciájában, életben maradásában. Ha egy ragadozó el is tudja fogni az egyébként rendkívül fürge halat, akkor sem tudja lenyelni, mert a kimerevített mellúszótüskéje által okozott seb a ragadozó állat pusztulásához is vezethet. Fölmerülhet a kérdés, hogy sikeressége vajon összefügg-e a törpeharcsa fajok közötti keveredéssel? Lehet-e ennek szerepe a túlélési stratégiában?

A fajok közötti természetes hibridizáció és introgresszió jelei nagyon sok taxonómiai csoportban kimutathatóak (RIESEBERG 1997, ARGUE és DUNHAM 1999, HARDMAN és PAGE 2003, PAYSEUR et al. 2004, SANZ et al. 2009). A növények 25 %-a és állatok körülbelül 10%-a képes interspecifikus hibrideket alkotni (MALLET 2005). Ennek a folyamatnak számos evolúciós és ökológiai következménye lehet, például egyes rendszertani csoportok összeolvadásával (RHYMER és SIMBERLOFF 1996) szaporodásukban elszigetelt új fajok, új

hibridek jelenhetnek meg, melyek introgresszió útján hozzájárulnak az örökítő anyag fajok közötti áramláshoz (ARNOLD és MARTIN 2009).

Bizonyos esetekben ez a jelenség az emberi beavatkozásoknak köszönhető vagy a fajok inváziójához is köthető (JOSÉ MADEIRA et al. 2005, BUCCIARELLI et al. 2002). Az emberi beavatkozások és hatások nagymértékben befolyásolják az édesvízi halak populációinak változását (FERGUSON 1990, CROSS 2000, JOSE MADEIRA 2005). Az introgresszió megváltoztatja a résztvevő fajok genetikai hátterét, ami befolyásolja adaptációs és inváziós képességüket, valamint a fajokat elválasztó ökológiai és biológiai határokat. A törpeharcsa esetében pontosan ez a jelenség figyelhető meg Magyarországon is.

Kutatómunkám során a Magyarországra behurcolt egyes törpeharcsa fajok előfordulását, jellemző fenotípusos bélyegeit és hibridizációját vizsgáltam morfológiai és molekuláris genetikai módszerekkel.

A vizsgálataimban megfogalmazott célkitűzéseim:

1. Az egyes törpeharcsa fajok morfológiai bélyegeinek vizsgálata több magyarországi populációból gyűjtött reprezentatív számú minta alapján.
2. Molekuláris genetikai vizsgálati módszer fejlesztése az Európába behurcolt három faj (*A. melas*, *A. nebulosus* és *A. natalis*) és hibridjeik elkülönítésére.
3. Mitokondriális szekvencia vizsgálatok elvégzése a Magyarországra behurcolt fajok azonosításához.
4. A tiszta fajok és hibridek előfordulási gyakoriságának becslése genomikai markerek és mitokondriális szekvenciák, valamint fenotípus összehasonlítások alapján.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1 A törpeharcsafélék (*Ictaluridae*) családjának bemutatása

A törpeharcsafélék (*Ictaluridae*) a sugarasúszójú csontos halakhoz és a harcsaalakúak (*Siluriformes*) rendjébe tartozó család. A családba 7 genusz és 48 faj tartozik (WILHELM 2013). Észak-Amerika mérsékelt égövi és szubtrópusi édesvizeiben őshonosak.

A családra jellemző táplálkozás rendkívül változatos, a növényi anyagoktól kezdve egészen a ragadozó életmódig. Erre a családra is jellemző az ikra- és ivadék- vagy fészekgondozás (BLUMER 1986, BLUMER 1986) és a rendkívüli hibernációs képesség (CRAWSHAW 1984). Gazdasági szempontból igen jelentősek, intenzív rendszerekben, iparszerű körülmények között termelik a nagyobb testű fajokat (VINGINDER 2005). Fajaik mind Észak-Amerikában, mind Európában igen népszerűek a sporthorgászok körében. Laboratóriumi körülmények között széles körben alkalmazzák kísérleti állatként.

A dorzálisan lapított fejen nyolc bajuszszál található. Kettő a fejen (ha például egy akváriumban megfigyeljük) felfelé hegyesen áll, mint a bika szarva, szimbolizálva ezzel talán az angol elnevezését, a "bullhead" kifejezést. Az orrnál, a szájszegletben kettő, illetve az állon négy darab bajuszszál látszik. Pikkely nélküli, áramvonalas test jellemzi. A gerincvonal mentén található egy hátúszó, általában egy tüskés, megcsontosodott, tűhegyes úszósugárral és hét hártýás úszósugárral. Ugyanilyen tűhegyes megcsontosodott tüske található a mellúszóban is. A háton, a farokúszó előtt található a zsírúszó, melynek szerepe egyelőre nem tisztázott. Kötőszöveti állományában nincs úszósugár.

A hazánkban megtalálható fajok az *Ameiurus* genuszba tartoznak. A genuszba hét faj tartozik. Ezek a snail bullhead (*Ameiurus brunneus*), a white catfish (*Ameiurus catus*), a black bullhead vagy fekete törpeharcsa (*Ameiurus melas*), a yellow bullhead vagy a sárga törpeharcsa (*Ameiurus natalis*), a brown bullhead vagy barna törpeharcsa (*Ameiurus nebulosus*), a flat bullhead (*Ameiurus platycephalus*) és a spotted bullhead (*Ameiurus serracanthus*). Néhány faj esetében csak a tudományos, latin nevet és angol megfelelőjüket tüntettem fel, mert nincs elfogadott magyar nevük (WEB 1.).

Az *Ameiurus* fajainak rendszertani besorolása:

Ország	Állatok (Animalia)
Alország	Kétoldali szimmetriájúak (Bilateria)
Főtörzs	Újszájúak (Deuterostomia)
Törzs	Gerinchúrosok (Chordata)
Altörzs	Gerincesek (Vertebrata)
Altörzság	Állkapcsosok (Gnathostomata)
Főosztály	Sugarasúszójú halak (Actinopterygii)
Osztály	Valódi csontshalak (Teleostei)
Öregrend	Pontyszerűek (Ostariophysi)
Rend	Harcsaalakúak (Siluriformes)
Család	Törpeharcsafélék (Ictaluridae, Gill 1861)
Nem	<i>Ameiurus</i> (Rafinesque, 1820)
Faj	<i>Ameiurus brunneus</i> Jordan, 1877
	<i>Ameiurus catus</i> , Linnaeus, 1758
	fekete törpeharcsa (<i>Ameiurus melas</i>) Rafinesque, 1820
	sárga törpeharcsa (<i>Ameiurus natalis</i>) Lesueur, 1819
	barna törpeharcsa (<i>Ameiurus nebulosus</i>) Lesueur, 1819
	<i>Ameiurus platycephalus</i> , Girard, 1859
	<i>Ameiurus serracanthus</i> , Yerger, Relyea, 1968

A besorolás, a fishbase.org és az Integrated Taxonomic Information System (WEB 2.) oldalak, illetve WILHELM (2013) alapján készült.

4.1.1 Az Európába behurcolt *Ameiurus* fajok jellemzése

A **sárga törpeharcsára** (1. ábra) (*Ameiurus natalis*, LESUEUR 1819) jellemző paraméterek: A farokúszó lekerekített, egyenesen levágott vagy kissé beöblösödő, de sohasem mélyen villás; a fej és a hátúszó kezdete közötti tájék összenyomható, a hát nem csontos; a száj szögletében lévő bajuszszálak körülbelül kétszer olyan hosszúak, mint az ornyílás mellettié. A felső bajuszszálak színe szürkétől sárgáig terjed, az alsóké sárgától fehérig; az anális úszó mély, hátulsó vége túlér a farokúszó első sugarainak eredésén. A mellúszó tüske közepén erősen fogazott (5. ábra). A torokbevágás és az alsó állkapocs bevágása közti távolság nagyobb, mint az alsó állkapocs bevágásától az alsó állkapocs csúcsáig.



1. ábra: A sárga törpeharcsa (forrás: <https://alchetron.com/Yellow-bullhead-5133955-W>)

Szaporodásbiológiai tulajdonságait tekintve ivarérettségét 2-3 éves korára éri el. Az ívási periódus (NOVOMESKA és KOVAC 2009) kb. két hétig tart, késő májustól kora júniusig (~15°C - 24°C-ig). Monogám faj, ikra- és ivadékörző. Fészkekre ívnak. Vagy csak az ikrás, vagy mindkét ivar építi a fészket. 300-700 db termékenyített ikra kerül a fészekbe. A fészket folyópartok közelében sekély vagy enyhén mélyített kisebb gödrökbe rakják, vagy köves aljzatot tisztogatnak meg. A farokúszóval vagy a mellúszó mozgatásával segítik a kelést. A tejes elkergeti az ikrást az ívás végeztével és tovább ő vigyáz a fészkekre (SIMON és WALLUS 2004). A kikelt kishalakat a tejes tereli össze, egy rajt alkotva bolyban úsznak (hétköznapi néven: "törpeharcsafelhőben").

Az ikra kelése, az inkubáció kb. 5-10 napig tart. Az év végére testhosszuk eléri a 7-8 cm-t.

A **barna törpeharcsa** (2., 3 ábra) (*Ameiurus nebulosus*, LESUEUR 1819) felső és alsó bajuszszálainak színe sötétbarnától feketéig terjed; az anális úszó vége nem éri el a farokúszó első sugarait. A torokbevágás és az alsó állkapocs bevágása közti

távolság kb. megegyezik, az alsó állkapocs bevágásától az alsó állkapocs csúcsáig terjedő távolsággal. A mellúszótüske hátsó oldalán (5. ábra) a fogazottság erős, egészen a csúcsáig tart, a csúcs felé tolt körmöt megfogja. Az anális úszóban a sugarak száma általában 21-24; a hátúszó hártájája észrevehetően nem sötétebb a sugaraknál.

Lassan folyó víz medrében, gyorsan felmelegedő tavakban, víz alatti gyökerekre előszeretettel készíti fészket. A homokosabb medrű vizeket is kedveli. Szaporodási időszaka május-június. Melegvízben ívik (21-27 °C). Ivarérettségét 2-3 éves korára éri el. Ívásukra és násztáncukra jellemző, hogy lehúzódnak egészen az aljzathoz közel és különleges tulajdonságuk, hogy egymást simogatják a bajszukkal, majd ugyanúgy körkörös táncba kezdenek ("head-to-tail").



2. ábra: Tőserdőtől származó márványozott barna törpeharcsa (saját fotó).



3. ábra: Vajáról származó márványozott barna törpeharcsa (saját fotó).

A **fekete törpeharcsa** (*Ameiurus melas*, RAFINESQUE 1820) (*Ictaluridae*, *Siluriformes*) (4. ábra) a Nagy-tavaktól Észak-Mexikóig (PAGE és BURR 1991) elterjedt. Mellúszó tuskéje hátsó oldalán a fogazottság gyenge vagy hiányzik (5. ábra), különösen a csúcsnál; ha megvan, általában csak az alap közelében fogja vissza a csúcs felé tolt ujjkörmöt. Az anális úszó sugárszáma többnyire 17-21; a hátúszó hártájája rendszerint sötétebb az úszó sugarainál. Homokos aljzatú medrekben is előfordul, de kedveli a folyóvizek csendesebb szakaszait is. Előszeretettel készíti fészket az agyagos aljzatú, kavicsos medrű tavakban, folyók

szélein. Szaporodási időszaka késő júniustól július elejéig tehető. A sárga törpeharcsával ellentétben kicsit melegebb víz hőmérséklet (21-30°C) aktiválja, illetve váltja ki az ovulációt. A fekete törpeharcsa esetében későbbi, 3 év körüli ivarérettséget írtak le a szerzők (SIMON és WALLUS 2004). Általában az ikrás készíti a kör alakú fészket. A násztánc körkörös. Az ikra kelése 5 napon belül várható.



4. ábra: Tőserdőből származó fekete törpeharcsa (saját fotó).

4.2 Az Ameiurus fajok európai elterjedése

A faji hovatartozásukat illetően általánosan elfogadott vélemény, hogy az *Ameiurus nebulosus* került behozatalra. Az első *Ameiurus melas* példányt először 1936-ban Európában, Hollandiában írtak le, majd amikor több országban is előkerült, szakmai vita indult a két faj európai elterjedését illetően (WILHELM 1998). Hosszú ideig ezeket a halakat kizárólagosan a barna törpeharcsa (*Ameiurus nebulosus* LESUEUR 1819) faj képviselőjének tartották (WHEELER 1978). Emellett WHEELER szerint az *Ictaluridae* családhoz tartozó *Ameiurus natalis* faj is bekerült az európai vizekbe.

A törpeharcsák Európa-szerte jelen vannak. A publikációk alapján azt mondhatjuk, hogy az egyedeket az esetek nagy százalékában morfológiai bélyegek alapján azonosították. Eredetileg a három faj, a barna, a fekete és a sárga törpeharcsa fajokat hurcolták be a kontinensre (CARLANDER 1969, CARLANDER 1977, WALTER et al. 2014). Az első szállítmányt a Mississippi medencéjéből tógazdasági, valamint akvarisztikai céllal hurcolták be 1871-ben Franciaországba (SPILLMANN 1961, VINGINDER 2003). 1885-ben további szállítmányok érkeztek Németországba (WELCOMME 1988, GEITER et al. 2002, POPA et al. 2006, PINTÉR 1976, RUTKAYOVA et al. 2013). WHEELER megállapítása szerint az Európába behozott törpeharcsák nagy része az *A. nebulosus* fajhoz tartozott. Emellett azonban meg kell említeni, hogy az *Ictalurus punctatus* faj is hasonlóképp került be Európa vizeibe (WHEELER 1978). Néhány évtizeden belül a törpeharcsák egész Európában elterjedtek, a Brit szigetek kivételével (TORTONESE 1970; WILHELM 1999). Azóta Olaszországban (TORTONESE 1970, WHEELER 1978, NOWAK et al.

2008), Franciaországban (CUCHEROUSSET et al. 2006, FAO 2010), Belgiumban (WHEELER és MAITLAND 1973, FAO 2010), Albániában (RAKAJ és FLLOKO 1995, FAO 1997, DHORA 2010), Portugáliában (DOADRIO 2001, GANTE és SANTOS 2002), Romániában (WILHELM 1998, NOWAK et al. 2008, POPA et al. 2006), Szlovákiában (KOSCO et al. 2000; KOSCO et al. 2004, HARTVICH ÉS LUSK 2006, HOLCIK 2006), Macedóniában (C.I.P. 2003) is bebizonyosodott a *melas* térhódítása újabb vízterületeken.

A magyarországi *Halászat* című szaklapban arról ír a szerző (PINTÉR 1991), hogy a fekete törpeharcsa 1871-es Európába telepítése után 1885-ben már Németországban lelkesedtek érte a tógazdák, amit azonban hamarosan nagy kiábrándulás követett az 1900-as években, de akkor már késő volt, mert egyfajta láncreakció indult el a térhódításukat és szaporodásukat illetően (HARKA 1997, MOLNÁR 1954, PINTÉR 1976, GARCIA-DE-LOMAS et al. 2009). A kis átlagsúlyú és méretű egyedek hamarosan kitöltötték a vízi ökoszisztémák számukra megfelelő nicheit és táplálékkonkurenssé váltak.

4.2.1 A sárga törpeharcsa elterjedése

Az *A. natalist* 1906-ban hurcolták be Olaszországba, ahol azóta is megtalálható (WILHELM 1999, RUTKAYOVA et al. 2013). Behozatalát tekintve nagyon kevés információ áll rendelkezésre. Mivel az egyedek azonosítása morfológiai bélyegek alapján történt, sok esetben a hozzá nagyon hasonló külső jegyeket viselő barna törpeharcsával azonosíthatták. Az azonban tisztán látszik, hogy a két másik fajjal együtt a sárga törpeharcsa is bekerült Európa vizeibe a XIX század végén. ELVIRA, Spanyolországban 2000-ben írja le, hogy a faj képviselői megjelentek Európában (ELVIRA 2000). Invazív terjedését Európa más területein nem jelezték.

4.2.2 A barna törpeharcsa elterjedése

XIX. század végén a barna törpeharcsa (*Ameiurus nebulosus*) tömeges betelepítésére is sor került több vízterületre. Ennek köszönhetően az ezredfordulón jelenléte feltételezhető volt mintegy 37 országban (RUTKAYOVA 2013, NOWAK et al. 2010), de azóta is tovább terjedtek északabbra (KAPUSTA et al. 2010), például Oroszországban írta le őket ELVIRA 2000-ben. A faj széles körben elterjedt Lengyelországban is. NOWAK (2010) leírja az *A. nebulosus* lengyelországi megjelenését, illetve teljes akklimatizálódását.

Sok évvel ezelőtt megállapítást nyert, hogy az *Ameiurus nebulosus* (LESUEUR) az egyetlen észak-amerikai faj a horvát vizekben (HOROSZEWICZ 1971; WITKOWSKI 2002). Megtalálható a faj Bulgáriában (UZUNOVA és ZLATANOVA 2007), Csehországban (LHOTSKY 1995, FRANK 1956). Azonosításuk sok esetben problémákat okozott. Azonban 2007-ben egy másik, az *Ictaluridae* családból származó harcsát, a fekete törpeharcsát (*Ameiurus melas*, RAFINESQUE) is megtalálták a Kielcei Szydłówek-víztározóban, az Ewiewotkrzyskie területben (NOWAK et al. 2010).

4.2.3 A fekete törpeharcsa elterjedése

Európai honosítása a múlt század végén indult, első képviselőiket 1871-ben hozták be Franciaországba a Mississippi vidékéről (HARKA 1997). Németországba először 1880-ban, majd 1885-ben importálták, innen terjedt kelet felé, azonban annak pontos időpontja nem jelölhető meg. Ennek oka, hogy 1871-től folyamatosan érkeztek Észak-Amerikából a törpeharcsa szállítmányok, és földrészünk több nyugati országában telepítették halastavakba és természetes vizekbe ezt a fajt is (PINTÉR 1991).

Bár az európai populációk fajmeghatározása morfológiai bélyegek alapján bizonytalan, a fekete törpeharcsa mára a legelterjedtebb *Ameiurus* faj Európában (WHEELER 1978). Korábban 23 országban számoltak be az *Ameiurus melas* előfordulásáról (RUTKAYOVA 2013) és annak folyamatos terjedéséről. Terjedésének egyik lehetséges oka az, hogy a környezeti feltételek széles körét képes tolerálni (SMITH 1949, STUBER 1982). Olaszországban először 1904-ben jelent meg (TORTONESE 1970), és most az ország legnagyobb részén előfordul (PEDICILLO et al. 2008). Míg az *A. melas* térhódítása a Tiberis folyón kezdődött el, addig az egyik legelterjedtebb populáció a Corbara víztározóban található (LORENZONI et al. 2006). Romániában az első egyedet 1997-ben írta le WILHELM (1998), Szlovákiába 1999-ben került be (KOSCO et al. 2000), Portugáliába 2002-ben (GANTE és SANTOS 2002), a Cseh Köztársaságba 2003-ban (LUSK et al. 2010), Szerbia vizeiben 2005-ben (CVIJANOVIC et al. 2005) és az Ibériai-félszigeten 2009-ben közölték előfordulásukat újabban meghódított vizekben (GARCIA-DE-LOMAS et al. 2009). 2007-ben Észak-Lengyelországban is megállapítást nyert térhódítása.

Európai terjedése Spanyolországban (ELVIRA 1984) is folytatódott, először a Guadalquivir torkolatában regisztrálták. Az *A. melas* nagyarányú előfordulását írták le és számszerűsítették két egymást követő vizsgálatban (októberben és decemberben) 2007 és 2008 között. Inváziója új veszélyt jelent a biológiai

diverzitásra a Guadalquivir torkolatában és a kapcsolódó természeti parkokban, víztározókban (például a Doñana Nemzeti Parkban). Ezen kívül megfogalmazódott, hogy a halászati és akvakultúra-halgazdaságoknak esetleges gazdasági károkat is okoz.

Spanyolországban a felelőtlen telepítések gyorsan megnövelték az elterjedési területét az Ibériai-félszigeten. Jelenleg az *A. melas* említik az Ebro- (Észak-Spanyolország), Guadarrama- (Spanyolország központja) (LEUNDA et al. 2008), Tagus- és Guadiana- (közép- és dél-portugáliai) folyókban (GANTE és SANTOS 2002, RIBEIRO et al. 2009).

4.2.4 A fajok magyarországi megjelenése

Az első törpeharcsák Magyarországra telepítésének időpontját SPILLMANN (1961) 1902-re teszi (PINTÉR 2002). Németországból hazánkba egy iharosi tógazda segítségével került, majd nagy gazdasági hasznot remélve, a magyar állam támogatásával, hirdetések segítségével országos érdeklődés övezte (MOLNÁR 1954). Az Európába behurcolt három faj közül az *A. nebulosus* és az *A. melas* fajok kerültek be az Magyarországra. A Körös-vízrendszerének vizsgálatát GYÖRE és SALLAI (1998) szerzőpáros végezte 1994 és 1997 között. Mind a fekete, mind a barna törpeharcsa jelenlétéről beszámolnak. Az *A. nebulosus* hamarosan szélesebb körben elterjedt fajjává vált (WILHELM 1999). A fekete törpeharcsa hazai előfordulását először ANTONESCU jelezte a Marosból 1934-ben. Ezt követően 1980-ban Olaszországból importáltak Magyarországra *A. natalist* a dinnyési tógazdaságba, majd onnan számos haltenyészetbe került, köztük a szarvasi Haltenyésztési Kutatóintézetbe is (WILHELM 1998), és rohamosan terjedni kezdett (HARKA 1997, MOLNÁR 1954, PINTÉR 1976, PINTÉR 1991, GARCIA-DE-LOMAS et al. 2009).

A későbbi halfaunisztikai megfigyelések szerint az *A. melas* fokozatosan szorította és szorítja ki az *A. nebulosust* a természetes vizekben (GYÖRE és SALLAI 1998, SALLAI 2001).

A csupán morfológiailag vizsgált *A. melas* terjedésével a két faj (*A. nebulosus* és *A. melas*) introgresszív hibridizációját feltételezték (HARKA és PINTÉR 1990). Az ilyen hibridek vagy akár a tiszta fajok morfológiai azonosítása azonban még tapasztalt, jól képzett szakemberek számára is kihívást jelent (RUTKAYOVA et al. 2013).

A törpeharcsa Európába, de Magyarországra való behozatalát is az a remény vezérelte, hogy értékes tagja lesz a hazai tavi kultúránknak. Falánkságával azonban nagy károkat okoz, mind természetes vizekben, mind pedig tavi kultúrákban. Gazdasági jelentősége csak az utóbbi időszakban, az intenzív technológiák fejlődésének köszönhetően (VINGINDER 2003, VINGINDER 2005) mutat némi növekvő tendenciát, kihasználva ezeknek a fajoknak a kiváló húsminőségét.

Eredetileg szürke harcsa (*Silurus glanis*, LINNÉ 1758) minőségű halnak vélték. A törpeharcsa húsa ízletes, fogyasztási szempontból kiváló minőségű. A piacon mind nyers, mint feldolgozott formában igen keresett (PINTÉR 1976). Természetes állományai vizeinkben egyre növekednek, néhol uralkodó fajjává váltak. Eredeti (amerikai) élőhelyén általában nem, vagy csak ritkán ívik össze.

A magyarországi törpeharcsákon végzett részletes vizsgálatok kiderítették, hogy azok az *Ameiurus nebulosus* fajba tartoznak, bár a környező országokban élő fajtársaikkal egyetemben a fajnak egy új, az amerikaiaktól eltérő alfaját alkotják, amely megkülönböztetésül az *Ictalurus nebulosus pannonicus* nevet kapta (HARKA és PINTÉR 1990).

Általában veszélyes ikra-és ivadékpusztítónak tartják. VOSTRADOVSKY (1958) vizsgálataihoz a törpeharcsák 75%-át más halfajok ivadékának tömeges előfordulási helyein gyűjtötte, ennek ellenére egyetlen emésztőtraktusban sem talált halivadékot. A törpeharcsa alkalomszerű ivadék- és ikrafogyasztásával kapcsolatos adatok általában tógazdasági körülményekre vonatkoznak (PINTÉR 1976).

4.3 Fajmeghatározási módszerek halaknál

A halak fajazonosítása hagyományosan külső morfológiai bélyegek alapján történik. Ha csak a külső, fenotípus alapján szeretnénk azonosítani a fajokat, akkor a legkülönbébb adatokat kell felvennünk egy egyedről, és a határozásban döntő szerepet játszó tulajdonságok igen széles skálán mozognak a különböző fajokban. Fontos határozó bélyeg például a hal alakja, a test színezete, az úszósugarak száma, az úszók megléte, illetve elhelyezkedése, formája (LINDSEY 1963, SPECZIÁR és BERCSÉNYI 2009, TELETCHEA 2009, RUTKAYOVA et al. 2013) és néhány esetben a kopoltyú íveket is számolják (STRAUSS és BOND 1990). Otolitokat is használnak, különösen akkor, ha egyik korábbi jellemző sem szerepel, például a fossziliák (YANG et al. 2004) vagy gyomor-tartalom azonosítására (PIERCE és BOYLE 1991, GRANADEIRO és SILVA 2000).

Számos esetben mégis nagyon nehéz a közeli rokon fajok elkülönítése, mert eltérő környezeti adottságok esetén, különböző populációk, vagy eltérő fejlődési szakaszban lévő egyedek között jelentős különbség lehet akár egy fajon belül is. Ezért a fenotípusos vizsgálatoknál a testformákkal és arányokkal szemben előtérbe kerülnek a kvalitatív és merisztikus bélyegek. Később a morfometriát (ROHLF 1990) és a geometriai morfometriát (IBANEZ et al. 2007) is előtérbe helyezték a fajok és a hibridjeik azonosítására (HANNE et al. 2008).

Azonban ezeket a módszereket is nagyban befolyásolják a környezeti (JORGENSEN et al. 2008) faktorok, valamint az egyéni különbségek (NOWAK et al. 2011). Ezért mára előtérbe kerültek a molekuláris genetikai markerek, amelyek megbízhatóbb azonosítást tesznek lehetővé.

Ezek közül sok fajnál, így a halaknál használták először a fehérje alapú fajazonosítási technikákat, így az enzim polimorfizmust (POTEAUX et al. 2000, REHBEIN 1990) és kapilláris elektroforézist (KVASNICKA 2005,), illetve a nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát, azaz HPLC-t (HUBALKOVA et al. 2007), vagy immunoassay rendszereket, például Enzyme- Linkelt Immuno Sorbent Assay-t, azaz az ELISA-t (ASENSIO és MONTERO 2008). Azonban ezek relatív nagy minta- és munkaigénye és/vagy költsége miatt napjainkban leginkább a PCR-alapú DNS-technikákat (CALO-MATA et al. 2003) alkalmazzuk.

TELETCHEA 2009-ben írt átfogó tanulmányt a fajazonosítás PCR-alapú módszereiről halaknál. Véleménye szerint a PCR-RFLP módszere (CHAKRABORTY et al 2005, CHAKRABORTY 2007, MÜLLER et al. 2012, WOLF et al. 1999, WOLF et al. 2000), a PCR-FINS (például a mitokondriális szekvencia analízisek (MÜLLER et al. 2010, CARRERA et al. 2000, ESPINEIRA et

al. 2008) és a faj-specifikus primerek a leginkább használtak. De több másik felmerülő módszer, nevezetesen a valós idejű PCR és a mikrochip (microarray) technológia, a mikroszatellitek (LU et al. 2001) és az AFLP (SCOTTI-SAINTAGNE et al. 2004), vagy akár az egyszerű nukleotid polimorfizmus (SNP) vizsgálatok (FITZPATRICK et al. 2009) is új lehetőségeket kínálnak. A molekuláris biológia fejlődése és alkalmazása az elmúlt tíz évben gyakorlatilag minden fajnál, így a halak esetében is lehetségessé vált.

Segítségükkel nemcsak a fajok, de a hibridjeik is azonosíthatóvá váltak (GLOVER et al. 2010). A DNS vizsgálata új perspektívákat kínál a különböző alkalmazások fejlesztésében, amelyek még várhatóan tovább fognak növekedni a jövőben.

1. táblázat: A kilenc leggyakoribb DNS-alapú genetikai fajazonosítási módszer halaknál, melyet 1997 és 2007 között különböző szerzők publikáltak. TELETSCHEA (2009) munkája nyomán (a referenciák pontos hivatkozásai az eredeti cikkben megtalálhatóak).

	Alkalmazott technikák	Referenciák száma
1.	PCR-RFLP	71
2.	Szekvenálás	43
3.	Fajspecifikus primerek	23
4.	SSCP	9
5.	Valós idejű (Real-time) PCR	9
6.	RAPD	5
7.	DGGE	5
8.	AFLP	3
9.	Microarray	1

4.3.1 PCR elvi alapjai

A fent említett módszerek közül a legáltalánosabban használt fajmeghatározási módszerek alapjául szolgáló technika, a polimeráz láncreakció (PCR=polimerase chain reaction). Mivel ez a módszer volt a kutatómunkám vezérvonala, ezért a továbbiakban ezt a módszert mutatom be a legrészletesebben.

A polimeráz láncreakció lehetővé teszi egy adott DNS-szakasz *in vitro* sokszorosítását (CESPEDES et al. 1999, CARRERA et al 1999b) és amplifikációját. A módszer kidolgozása Mullis nevéhez fűződik, aki kollégáival 1985-ben számolt be az első hőstabil ezimel végzett DNS sokszorosításról (SAIKI et al. 1985). Segítségével egy vagy több DNS-szekvencia közel exponenciálisan sokszorosítható, egymást követő, szabályozott hőmérsékleten végrehajtott reakciók ciklusain keresztül, ahol a kiválasztott DNS szekvenciájával megegyező másolatok képződnek enzimatis úton.

A reakció komponensei: a DNS sokszorosítani kívánt részlete, célszekvenciája (templát DNS); primerek, melyek a kiválasztott, amplifikálandó DNS szakasz 3' végeinek szintetikus előállított komplementerei; nukleotidok (dNTP), a DNS „építőkövei”; DNS polimeráz enzim és más kiegészítő stabilizáló vegyszerek. A polimeráz láncreakció három egymást követő lépésben valósul meg:

1. A kétszálú DNS szétválása, denaturációja 92-96 °C-on.
A kétszálú DNS-t összetartó H-hidak megszüntethetők magas hőmérsékleten, ahol egyszálú DNS képződik. 94 °C-on 1 perc elegendő a genomikus DNS teljes denaturálásához (templátképzés). Mivel a genomikus DNS aránya csökken a reakció előrehaladtával, a későbbi ciklusokban 92-93 °C-on 10-40 mp is elegendő a képződött, új rövid szálak szétválásához, de nem elegendő a genomikus DNS teljes denaturálásához.
2. Primerek feltapadása (annealing) a templát komplementer helyeire 35-70 °C között.
Az amplifikálandó DNS-szakaszt a primerek kiválasztásával határozzák meg. A primerek rövid, mesterséges DNS-szálak – 50 nukleotidnál (általában 18-25 bp) kevesebb alkotja őket – amelyek komplementerek az amplifikálandó DNS-szakasz elejével és végével. Hozzákapcsolódnak a DNS-templáthoz

ezen a kezdő- és végpontokon, ahová a DNS-polimeráz kötődik, és megkezdődik egy új DNS-szál szintetizálása.

A denaturáláskor egyszálúvá lett és a hirtelen visszahűtött DNS mérete miatt nem tud elég gyorsan újra egyesülni, viszont lehetővé teszi a feleslegben levő kisméretű primer molekulák egy részének, hogy azok megtalálják komplementer szekvenciájukat és ahhoz hozzátapadjanak. A feltapadás után a láncépítés azonnal megkezdődik és a növekvő szál, termék olvadási hőmérséklete minden egyes bázis hozzáadására nő. A reakció feltapadási hőmérséklete nem lehet nagyobb a primer olvadási hőmérsékleténél, mert ekkor a feltapadás és láncindítás nem fog létrejönni.

A primerek hosszának és olvadási hőmérsékletének kiválasztásakor több dolgot is figyelembe kell venni. A primer olvadási hőmérséklete definíció szerint az a hőmérséklet, amelynél a primer kötőhelyeinek fele foglalt. Az olvadási hőmérséklet nő a primer hosszával. A túl magas olvadási hőmérsékletek, pl. 80 °C felett, azért jelentenek gondot, mert a DNS-polimeráz kevésbé aktív magas hőmérsékleten. A primer optimális hossza általában 20-40 nukleotid, 60 °C és 75 °C közötti olvadási hőmérséklettel.

3. Primerek növesztése (elongation) a DNS-polimeráz segítségével 72 °C-on.

A primer-növesztés szakaszában játszódik le az új lánc szintézise, a már láncindító szekvenciaként viselkedő primer tökéletesen feltapadó 3' végéről. A primerek mindig ellenkező irányítottságúak, mindig a rájuk jellemző szálát választják ki, ezért a komplementer templát szálakon, de egymással szemben növekednek. A hőmérséklet beállításakor ügyelni kell a DNS-polimeráz optimumára, ami általában 72-73 °C. Ennek a hőmérsékletnek a gyors elérése fontos a termék ugrásszerű hosszabbodása és disszociációjának megelőzése érdekében.

A szétválás, feltapadás és növesztés együttesét nevezzük ciklusnak, melyek ismétlődése vezet el végül a DNS sokszorosításához. Ha mindkét primer szelektíven tapad a megfelelő egyszálú templát komplementer részéhez és az elongációk során az újonnan szintetizált DNS-szálak túlnyúlnak az ellenprimer tapadási helyén, akkor ezen szálak is célszekvenciaként fognak szolgálni, növelve a rendelkezésre álló templát mennyiségét ciklusról ciklusra. Ha a kiindulási templát egy kópiában fordul elő és a sokszorosítás hatásfoka 100%, akkor harminc ciklus után a sokszorosítási kivánt DNS-szakasz mennyisége eléri a 10^{12} szintet. Ez az óriási kópiaszám lehetővé teszi a felsokszorozott célszekvencia analízisét.

4.3.2 A leggyakoribb PCR-alapú, fajazonosításban alkalmazott technikák

PCR-RFLP (restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus)

A PCR-RFLP egy olyan rendkívül népszerű eljárás, amelyben a restrikciós endonukleázokkal hasítják az amplifikált fragmenteket (*1. táblázat*). Számos tanulmányban írnak a módszer alkalmazásáról, különböző fajokon (ZHANG et al. 2006, ZHANG et al. 2007, ARANISHI 2005a, ARANISHI 2005b, ARANISHI et al. 2005a, ARANISHI et al. 2006b, AKASAKI et al. 2006). A különböző fragmenteket ezután agaróz gélelektroforézissel választják el. Egyszerű, könnyebb elvégezni és kevésbé költséges, mint a PCR-termékek szekvenálása (CARRERA et al. 1999a, 1999b). Általában a betegségek nyomonkövetésére használatos módszer, de a mitokondriális DNS PCR-RFLP vizsgálata is nagyon elterjedt a taxonómiában, közeli rokon fajok elkülönítésére (BOTSTEIN et al. 1980).

Szekvenálás

A szekvenálás (PROBER 1987) szintén széles körben elterjedt módszer a taxonómiában. Az állatfajok rendszerezéséhez egy univerzális, mitokondriális szekvenciát, markert szoktak használni, hogy az úgynevezett "DNS-vonalkódként" vagy „bárkódként” szolgáljon (HEBERT et al. 2003a, HEBERT et al. 2003b).

Ez a DNS vonalkód a "Folmer fragment" (FOLMER et al. 1994) sorozat a mitokondriális citokrom oxidáz I. gén (COI) polimorf része, amely felhasználható az azonosításra a magasabb taxonok között nagyon sok állatfaj esetében. Halaknál a fajok azonosítására szolgáló COI (WARD et al. 2005) alkalmazhatósága valójában a halak vonalkódolására irányuló nemzetközi kezdeményezés. Ez a FISH- BOL projekt (WEB 3., KOCHZIUS 2009, WARD et al. 2009).

Felhasználták ezt a genetikai azonosítási módszert a fogyasztók védelme érdekében a tengeri termékek azonosításakor is (SOTELO et al. 2001, ESPINERIA et al. 2008, SMITH et al. 2008, WONG és HANNER 2008, YANCY et al. 2008).

Vagy például hogy ellenőrizzék halászokat (WARD et al. 2008, MOURA et al. 2008, HOLMES et al. 2009), valószínűleg kriptikus fajok felderítése (STEINKE et al.

2009, ZEMLAK et al. 2009) és még új fajok leírására is alkalmas (ASTARLOA et al. 2008).

Fajspecifikus primerek alkalmazása

Ez a módszer lehetővé teszi a fajok specifikus azonosítását egyedi oligonukleotidok segítségével (WUERTZ et al. 2007). Multiplex PCR-változat lehetővé teszi sok fajspecifikus DNS-szakasz egyidejű felsokszorozását. Ezt használta MICHELINI et al. (2007) egy egylépésből álló triplex PCR-alapú technikával, a sárgaúszójú tonhal (*Thunnus albacares*), a nagyszemű tonhal (*Thunnus obesus*) és a csíkos hasú tonhal (*Katsuwonus pelamis*) közötti különbség kimutatására.

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

A módszer az egyszálú DNS másodlagos szerkezetében renaturáló körülmények között kialakuló szekvencia-specifikus különbségek kimutatásán alapszik (egyszálú konfirmációs polimorfizmus). Az egyik legegyszerűbb és talán az egyik legérzékenyebb módszer a PCR-technológián alapuló mutációk kimutatására (ASENSIO et al. 2001). A felsokszorozott terméket egyszálú formában denaturálják (ssDNS) és nem denaturálva poliakrilamid gélen (PAGE) futtatják. WEDER et al. (2001) a tonhal és bonito fajok azonosítására fejlesztettek ki egy SSCP-módszert, megkülönböztetve ezzel más hal- és állatfajokat.

Real-time PCR

Valós idejű PCR (más néven kvantitatív PCR, vagy qPCR) egy gyors módszer (WATANABE et al. 2004) az egyidejű DNS-amplifikációra és annak mennyiségi meghatározására. A valós idejű PCR-ben egy fluoreszcens riporter molekula van a vizsgálati keverékben. Ezzel a technikával, nagy pontossággal meg tudjuk határozni a PCR reakcióban keletkező DNS mennyiségét, egy DNS-szakasz jelenlétét, vagy hiányát, vagy több DNS-szakasz egymáshoz viszonyított mennyiségét, ami sok szempontból igen hasznos lehet (LOCKLEY és BARDSLEY 2000). Maga a számszerűsítés pontossága nagymértékben függ a DNS kiindulási mennyiségétől. Ezt a módszert használták (OVERDYK et al. 2016) *Epinephelus* és *Mycteroperca* fajok azonosítására (TROTTA et al. 2005).

DGGE (denaturáló gradiens gélelektroforézis)

Ez a módszer a kétszálú DNS egy fontos fizikai tulajdonságán, az oladási hőmérsékleten alapul. Az előzetesen PCR-rel felamplifikált DNS poliakrilamid denaturáló gradiens gélben futva részlegesen szétnyílik. A részlegesen felnyílt DNS - mobilitása nagymértékben lecsökken. Ez azonos méretű, de különböző bázisösszetételű fragmentek esetén eltérő futási magasságban történik. A DGGE ideális genetikai mutációk kimutatására, de használható DNS-fragmentek olvadáspontjának meghatározására is. Egy olyan genetikai elemzési módszer, amelyet különböző genom vagy klónozott DNS és PCR amplifikált DNS egyetlen báziscseréjének vagy polimorfizmusainak kimutatására lehet használni. Ezt a módszert többnyire a mikrobiális ökológia területén használják (ERCOLINI 2004), de néhány esetben sikeresen alkalmazták *Pangasius* fajok azonosítására is (LE NGUYEN 2008).

RAPD (random amplifikált polimorf DNS)

A PCR véletlenszerű amplifikációjából áll. A RAPD (CALLEJAS és OCHANDO 1998, CALLEJAS és OCHANDO 2001) használat előnye, hogy gyors, hatékony. Segítségével nagyon könnyen azonosíthatunk olyan DNS-fragmenteket, amelyek egy faj egyedeiben jelen vannak, míg a vele közeli rokonságban levő fajokban nem találhatók meg. Ezek felhasználhatók fajazonosításban is. Azonban a módszer nagyfokú érzékenysége és gyenge ismételtetősége miatt mára már nem igazán használatos.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Az amplifikált vagy felerősített fragmenthossz polimorfizmus (ZHANG et al. 2004, VOS et al. 1995) lényege, hogy a restrikciós endonukleázok egy adott specifikus bázisrendet (restriction site) ismernek fel, amelyben, vagy attól meghatározott távolságra hasítják a DNS-molekulát. Az AFLP gyakorlatilag restrikciós enzimeket használ a genomiális DNS kivágására és adapterek ligálásával a ragados végekhez. A fragmenteket ezután horgonyzott komplementer primerek alkalmazásával amplifikálják úgy, hogy az adapterhez és a restrikciós hely egy részéhez tapadjanak. A végső amplifikáció után szelektíven az amplifikált fragmenteket gélelektroforézissel elválasztják és autoradiográfiával vagy fluoreszcens

technológiák által értékelik. Az AFLP egyesíti a RAPD és az RFLP előnyeit, és így nagyobb a reprodukálhatósága, a felbontása és az érzékenysége. Emellett az AFLP több száz genetikai markert generál, ami növeli a fajspecifikus és a populáció-specifikus polimorfizmus azonosításának valószínűségét. Ez a technika nem igényel előzetes tudást az érintett fajok DNS-szekvenciáiról. MALDINI et al. (2006) értékelte az AFLP technológia lehetséges felhasználásának módját hal és tengeri fajoknál (puhatestűek és kagylók esetében, valamint rákfélék fajmeghatározására).

Microarray

A microarray technológia (más néven DNS-chipek) lényege, hogy kisméretű üveglemezekre több tízezer eltérő szekvenciájú oligonukleotid próbát készítenek. A DNS microarray módszert széleskörűen alkalmazzák a genetika számos területén, mint például a funkcionális genomika. A teljes genomot átfogó genetikai különbség vizsgálatára is alkalmas. Az eljárás lényege továbbá, hogy mikroszkóp segítségével meghatározzák azokat a próbákat a chipen, amelyekkel komplementer DNS vagy RNS jelen volt a mintában. Ennél a módszernél a mintát fluoreszcens festékkel jelölik. Két újabb tanulmány (KOCHZIUS et al. 2008, TELETCHÉA et al. 2008) tovább vizsgálta a microarray technológiát a halfajok azonosításához. TELETCHÉA et al. (2008) kifejlesztett egy microarray-alapú módszert citokróm b-eredetű szondák felhasználásával, mellyel azonosíthatóvá vált 71 veszélyeztetett gerinces faj. A módszer hátránya, hogy költséges, lassú és nagyfokú felkészültséget igényel.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

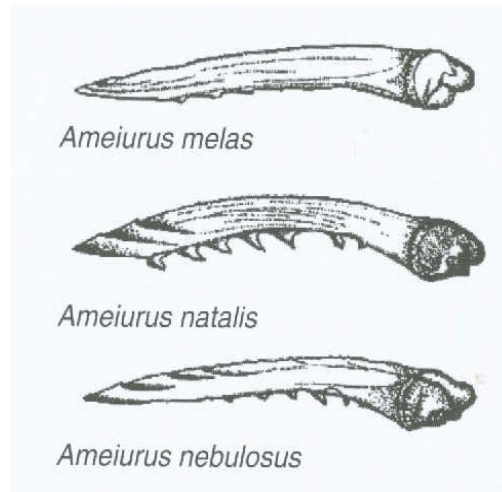
2. táblázat: Az elmúlt évtizedben a fajok azonosítására alkalmazott kilenc módszer összehasonlítása: A táblázat TELETCHÉA 2009 munkája alapján készült. Jelmagyarázat: a) DNS minőség: a kívánt DNS minősége, b) Intraspecifikus variációk: azok az eredmények, amelyeket a fajon belüli változatok befolyásolnak, c) Reprodukálhatóság: ugyanazon a kísérleti körülmények, a módszer hasonló eredményt ad, d) Kifejlesztési idő: a módszer elképzeléséhez, előállításához és kísérletezéséhez szükséges idő, e) Költség: az elemzés költsége (a fejlesztési idő nélkül), f) Gyorsaságelemzés: mennyi idő szükséges a DNS kivonásától az eredmények véglegesítéséig, g) A legfontosabb előny a többi elérhető módszerhez képest, h) A legfontosabb hátrány a többi elérhető módszerhez képest.

Technika	DNS minőség ^a	Intraspecifikus variációk ^b	Reprodukálhatóság ^c	Kifejlesztési idő ^d	Költség ^e	Gyorsaság elemzés ^f	Fő előnyök ^g	Fő hátrányok ^h
PCR-RFLP	+	Igen	Igen	++	+++	++	Gyors	Befejezetlen emésztés
szekvenálás	+	Nem	Igen	+	++	++	Információ megbízhatóság	Költség
specifikus primerek	+	Igen	Igen	++	+	+	Gyors	Alacsony taxonómiai hatótáv
SSCP	+	Igen	Igen/Nem	+++	++	++	Gyors	Reprodukálhatóság
Real-time PCR	++	Nem	Igen	+++	+++	+	Kvantitatív	Költség
RAPD	+++	Nem	Igen/Nem	+	+	+	Gyors	Genomiális DNS minősége
DGGE	++	Igen	Igen	+	+	+	Gyors	Megkülönböztető képesség
AFLP	+++	Nem	Igen/Nem	+	++	++++	Érzékenység	Genomiális DNS minősége
Microarray	+	Nem	Igen	+++++	++++ ++	+++++	Kvantitatív és információ mennyiség	Kifejlesztési idő

A 2. táblázat alapján elmondható, hogy összehasonlítva a leggyakrabban használt technikákat, a specifikus primerekkel végzett fajazonosítás az egyik leggyorsabban, legköltségghatékonyabban kivitelezhető és viszonylag gyorsan kifejleszhető módszer. Bár a mitokondriális fragmentek szekvenálásán alapuló módszer (CESPEDES et al. 1999) elterjedtebb az univerzális használhatósága és nagyobb információ tartalma miatt (a későbbiekben ez a két módszer került alkalmazásra).

4.4 A törpeharcsa fajok morfológiai azonosítása

A törpeharcsa fajok esetén igen nagy gyakorlat kell a fajok elkülönítéséhez. Számos morfológiai bélyeget (BYRKJEDAL et al. 2007, CASPER et al. 2007), a hát-, has-, a mell- és a farok alatti úszósugarainak számát, a mellúszó tüske fogazottságát és morfometriai méreteket hasonlítottak össze az európai *A. nebulosus* és *A. melas* fajok között, azonban egyik tulajdonság sem bizonyult megbízható bélyegnek.



5. ábra: Törpeharcsák preparált mellúszó tüskéinek fogazottsága, fajok szerinti csoportosításban.
(SIMON és WALLUS 2004)

A kutatók minden egyes bélyegnél jelentős átfedéseket tapasztaltak a két faj között. Az eredeti őshazában leírt fontos határozó bélyegek közül a mellúszó tüske fogazottsága sem volt használható (5. ábra), mivel nem találtak olyan egyedet, amelynél a mellúszó tüskéje nem volt fogazott, ami a fekete törpeharcsára jellemző, illetve a fogazottság mértéke és helye nem felelt meg a barna törpeharcsára leírtaknak sem.

Összességében elmondható, hogy talán a legalkalmasabb határozó bélyeg a színezettségén kívül a farok alatti úszósugárszám (WILHELM 1998).

3. táblázat: A fark alatti úszósugárszámok változása Európában (HARKA és PINTÉR nyomán módosítva, WILHELM 1998)

Szerző	Ország	<i>Ameiurus nebulosus</i>
BERG 1949	Szovjetúnió	17-24
HOLCIK 1972	Csehszlovákia	17-23
WILHELM 1980	Románia	16-22
MALETIN 1982	Jugoszlávia	18-22
HARKA és PINTÉR 1990	Magyarország	17-23

Azonban a fark alatti úszósugárszám is jelentős változatosságot mutat. Számos magyar és európai vizsgálatból állnak rendelkezésre adatok a múlt évszázadtól egészen a 70-es évekig (3., 4. táblázat), amelyek átfedést mutatnak. A barna törpeharcsa esetében magasabb ez a szám, (16)/21-24 között változik, míg a fekete törpeharcsánál kisebb 16-22. (4., 5. táblázat). Mégsem mondható ki teljes pontossággal és biztonsággal határozó bélyegként.

4. táblázat. A két törpeharcsa faj fark alatti úszósugárszáma Észak-Amerikában (HOLCIK nyomán, WILHELM 1998)

Szerző	<i>A. nebulosus</i>	<i>A. melas</i>
JORDAN és EVERMANN 1896	21-22	17-19
SLASTENENKO 1956	19-24	16-22
TRAUTMAN 1957	21-24	16-22
HUBBS és LAGLER 1964	21-24	17-21
SCOTT és CROSSMANN 1969	21-24	17-21

5. táblázat: *Ameiurus spp.* (MIZ 212733-212735) és kontroll (*A. melas* és *A. nebulosus*) egyedek morfológiai vizsgálatának eredménye (NOWAK et al 2010).

Rövidítések: TL= teljes hossz; SL= standard hossz; C=farokúszó; D= hátúszó; A= farok alatti úszó; P= mellúszó; ált.: általában					
Jelölés	MIZ 212733	MIZ 212734	MIZ 212735	<i>A. melas</i>	<i>A. nebulosus</i>
Teljes hossz (mm)	139	113	135	< 660 (ált. < 250)	< 550 (ált. < 250)
Standard hossz (mm)	106	95	113.5	-	-
Farokúszósugárszá m	17	17	17	15-18	18-19
Farok alatti úszósugárszám	22	20	21	17-21 (ált.18-20)	21-24 ált. 22-23)
Hátúszósugárszám	I 6	I 6	I 6	I 5-6	I 6-7

Mindezeket a megfigyeléseket többször is megerősítették, és a magyar kutatók az irodalmi adatok alapján mintegy 337 egyed vizsgálatának eredményeiből arra következtettek, hogy megváltozott környezeti adaptáció következtében kialakult egy új alfaj, melyet új taxonómiai besorolás követett. Az új alfaj, vagy hibrid az *Ictalurus nebulosus pannonicus* nevet kapta. Állításuk szerint nagy mennyiségben az *Ictalurus nebulosus* érkezett eredetileg a XX. század elején Magyarországra. Itt említik meg, hogy az európai szállítmányokban a barna-, fekete törpeharcsa mellett a sárga törpeharcsa is jelen volt. Továbbá kifejtik, hogy a fajok között természetes hibridizáció is lehetséges. Vizsgálataikból és megfigyeléseikből kiderült, hogy az oly jellemző pl. a fekete törpeharcsáknál megfigyelt világos színű sáv, farok úszó alapi részénél húzódo „csík” nem látszik, vagy sokkal vékonyabb, illetve gyengén felismerhető. Továbbá megállapították, hogy az úszóhártyák színe, mely szintén határozóbélyegként szolgált, kevésbé elhatárolt, füstös és egyértelmű. Egyetlen

vizsgált egyedben sem találták meg pl. ezt a határozó bélyeget. Végül az úszósugarak száma alapján vonták le azt a következtetést, hogy egy új alfaj keletkezett (HARKA és PINTÉR 1990).

A fajok közötti morfológiai különbségek eltűnését vagy összemosódását legutóbb 2014-ben vizsgálták részletesen *A. nebulosus* és az *A. melas* fajú egyedként azonosított kárpátaljai állományokon (MOVCHAN et al. 2014). A vizsgált kárpátaljai vizekben 2007-re tehető a fekete törpeharcsa megjelenése, melyről szintén ez a közlemény számol be. A tanulmányban a korábban leírt morfológiai különbségeket is vizsgálták, azonban a vizsgált állományokban nagy hasonlóságot állapít meg a két faj között, mely félreértésekre adhat okot.

A morfológiai bélyegek keveredésének egyik lehetséges oka a fajok közötti introgresszív hibridizáció. A természetes hibridizáció ritka az *Ictaluridae* családban (WELSH és CINCOTTA 2004). Az ilyenkor létrejött elsőgenerációs hibrid hordozza mindkét szülő génállományát és a fenotípusa a két kiindulási faj között helyezkedik, azok keveréke.

4.5 A törpeharcsa fajok genetikai azonosítása

A törpeharcsa fajok genetikai azonosításának egyik legbiztosabb módszere a mitokondriális DNS-szekvencia vizsgálata (ASAHIDA et al. 1997), mivel mindkét faj teljes mitokondriális genomja ismert (*A. melas*: Acc.No.: KT804702.1; *A. nebulosus*: Acc.No.: NC_036387.1) és megtalálhatók a FISHBOL bárkód adatbázisban is. Azonban emellett egy mitokondriális markert és egy a nukleáris RAG2 (recombination activating gene 2) gént vizsgáló PCR-RFLP markert is kifejlesztettek, amelyek alkalmasak a két faj azonosítására (HUNNICUTT et al. 2005, WALTER et al. 2014).

Azonban a hibridek azonosítása ennél bonyolultabb feladat, különösen, ha introgresszív fajkeveredés feltételezhető, mint a törpeharcsa fajok esetében. Matematikai modellezés alapján ilyen esetekben a hibridek besorolásához több mint négy marker lehet szükséges (BOECKLEN és HOWARD 1997). Ezért az introgresszív hibridizáció részletesebb vizsgálatához mindenképpen további markerekre van szükség.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1 A vizsgálatok helyszíne

A morfológia vizsgálatokat a Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszékén végeztem. A DNS-szintű vizsgálatok a Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont (KÖRET) Kutató Laboratóriumában történtek.

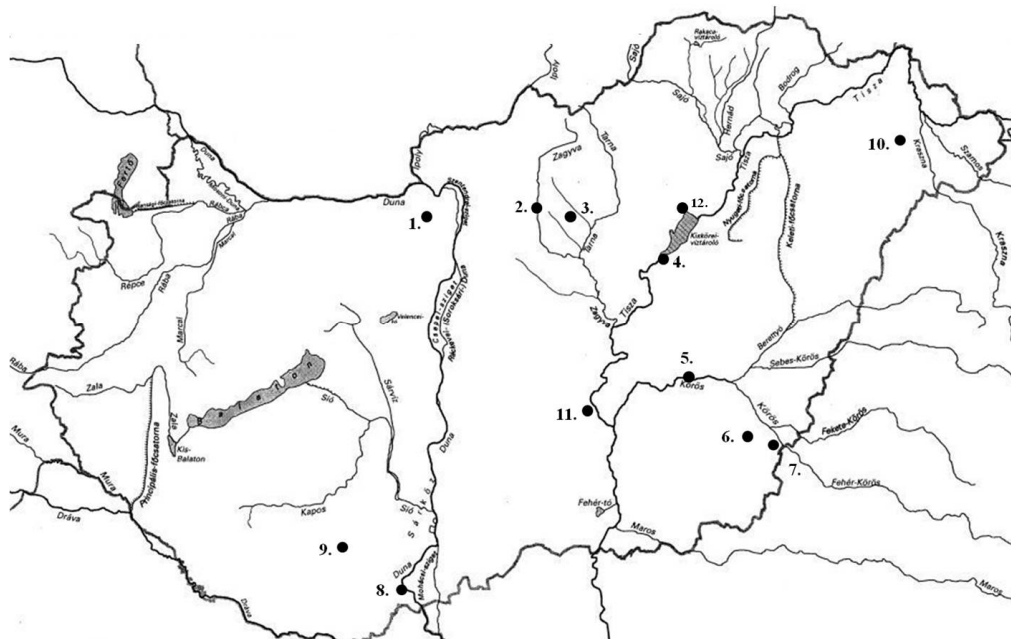
5.2 A kísérletekben felhasznált minták

5.2.1 A Magyarországon gyűjtött minták

A kísérletekben Magyarország egyes vízgyűjtő területein, természetes körülmények között élő törpeharcsa egyedek kerültek kifogásra különböző módszerekkel. Ezek közül a horgászhoroggal és az elektromos halászgéppel fogott egyedek szerepeltek döntő többségében. Előfordult olyan eset is, amikor varsás halászat alkalmával kaptam halakat kutatási célra. A halakat minden esetben szegfűszegolaj (*Syzygium aromaticum*) segítségével túlaltattam, és a morfológiai vizsgálatot ezután végeztem el. Ezt követően minden egyes egyedről farokúszó mintákat gyűjtöttem, amelyeket abszolút ethanolban -20 °C-on tároltam a további feldolgozásig a KÖRET laboratóriumának hűtőjében.

Morfológiai és molekuláris genetikai módszerrel 466 példányt vizsgáltam 11 magyar vízgyűjtő területről. A mintákat a következő tavakból és folyókból gyűjtöttem: a Dráva-folyóból Pécselt (Majláthpuszta), a Hármaskörös-folyóból Gyomaendrődről, a Vaja-tóból, a Pilisvörösvári-tóból, az Adácsi-tóból, a Körös-folyóból Dénesmajornál, a Jászsági-csatornából (összeköttetés a Tiszával), a békéscsabai Kettős-Körösből, a Hatvani Lőrinci-tóból (összeköttetés a Zagyva folyóval), Külső-Béda-tóból Mohácsnál (a Dunával összeköttetés), valamint a Szikra-Holtvízből Töserdőben. A Magyar Természettudományi Múzeum tárolja azokat a mintákat, melyeket HARKA és PINTÉR 1990-ben befogott a Tisza-folyóból, Poroszlónál (12. élőhely). A 6. ábra mutatja a mintavételi helyek elhelyezkedését, míg a 6. táblázat összegzi az összegyűjtött példányok számát.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER



6. ábra: Magyarországi törpeharcsa fajok mintavételi helyei. 1. Pilisvörösvári-tó, 2. Lőrinci-tó (Hatvan), 3. Adácsi-tó, 4. Jászsági-csatorna, 5. Hármaskörös folyó (Gyomaendrőd), 6. Kettős-Körös folyó (Békéscsaba) 7. Körös folyó (Dénesmajor), 8. Külső-Béda-tó (Mohács), 9. Dráva folyó (Pécs-Majláthpuszta), 10. Vaja-tó, 11. Szikra-holtág (Töserdő), 12. Poroszló.

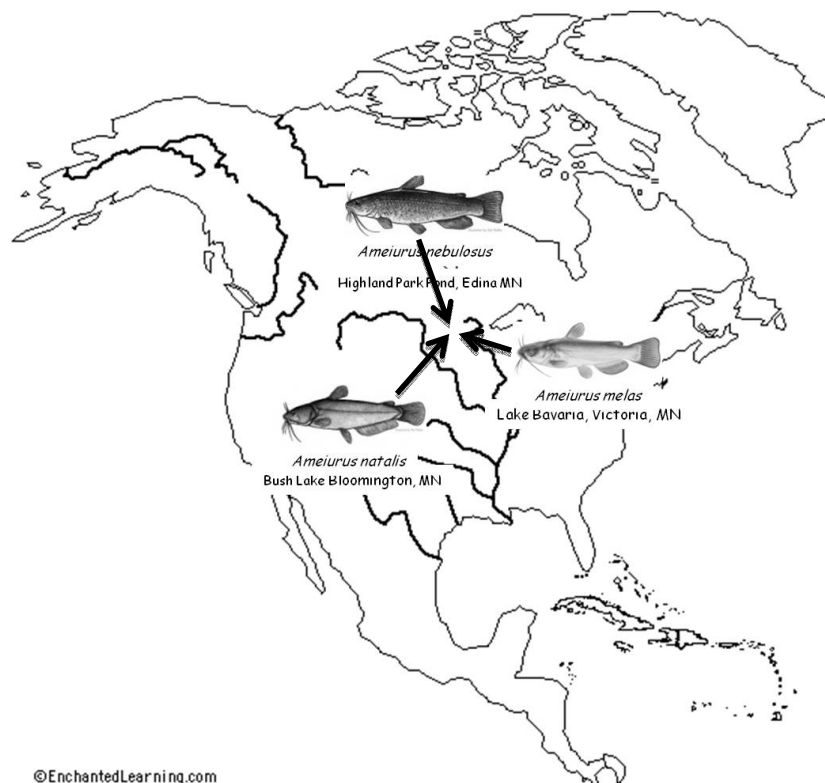
6. táblázat: Mintavételi helyek pontos koordinátái és a vizsgált egyedek száma

Mintavételi helyek sorszama	Mintavételi helyek	Koordináták	Egyedszám
1.	Pilisvörösvári-tó	47°36'44.4"N 18°54'55.5"E	13
2.	Lőrinci-tó Hatvan	47°42'56.3"N 19°40'49.9"E	51
3.	Adácsi- tó	47°42'20.7"N 19°57'08.3"E	56
4.	Jászsági-csatorna	47°30'42.9"N 20°29'37.3"E	6
5.	Hármaskörös folyó (Gyomaendrőd)	46°56'30.2"N 20°48'12.8"E	8
6.	Kettős- Körös folyó (Békéscsaba)	46°44'35.9"N 21°11'21.6"E	11
7.	Körös folyó (Dénesmajor)	46°39'14.5"N 21°25'28.9"E	114
8.	Külső-Béda-tó (Mohács)	45°55'52.2"N 18°46'07.3"E	30
9.	Dráva folyó (Pécs)	45°47'11.1"N 18°03'34.6"E	52
10.	Vaja-tó	47°58'46.7"N 22°09'09.8"E	75

11.	Szikra-Holtág (Töserdő)	46°51'14.2"N 19°59'25.7"E	50
12.	Poroszló (múzeumi minták)		14
Σ	Magyarországon gyűjtött egyedszámok a múzeumi minták kivételével		466

5.2.2 Az észak-amerikai kontinensről származó minták

Genetikailag kontrollként 20 mintát (~2cm² farokúszó) vizsgáltam meg az Európába behozott három törpeharcsa faj mindegyikéből. A mintákat dr. Hanping-Wang professzor (Ohio State University South Centers) bocsátotta rendelkezésemre. A farokúszókat az USA-ból származó natív élőhelyükről gyűjtötték össze morfológiai vizsgálatokat követően (7. ábra). A fekete törpeharcsa minták a Highlands Park Pond-tól, Edina, MN. (44 ° 54 \ '37.9 ° N 93 ° 22 \ '02 .1 \ "W), sárga törpeharcsa minták a Bajor-tó, Victoria, MN (44 ° 50 \ '12 .7 \ N 93 ° 38 \ 3535 W), és a barna törpeharcsák, Bloomington, MN-ből származnak. (44 ° 50 \ '09 .8 \ "N 93 ° 23 \ 3 .2 \ " W). A mintákat 96% -os ethanolban tároltam további feldolgozásig a KÖRET laboratóriumának -20°C-os hűtőjében..



7. ábra: Az eredeti élőhelyről származó törpeharcsa mintavételi helyek a genetikai alapvizsgálatokhoz, az Amerikai Egyesült Államokban. (WEB 4.)

(forrás: saját szerkesztés internetes térkép alapján)

5.2.3 Magyar múzeumi minták

A korábban összegyűjtött hibrid, *Ictalurus nebulosus pannonicus* alfajként azonosított halak mintáit a Magyar Természettudományi Múzeum Hal Gyűjteménytára bocsátotta a rendelkezésemre. Összesen 1 holotípus és 13 paratípusmintát (azonosítóval) biztosítottak számomra. A 14 példányt Harka Ákos és Pintér Károly gyűjtötte össze (HARKA és PINTÉR 1990). Az egyedeket formalinban fixálták, majd alkoholban tárolva őrzik a Múzeumban. A példányok azonosítását, valamint a gyűjtés helyét és idejét az alábbi listában mutatom be:

- HOLOTÍPUS leltári szám: 87.1.1 (1 egyed) *Ictalurus nebulosus pannonicus*. Poroszló (6. ábra, 12. szám), Tisza (1987. április 14.)
- PARATÍPUS leltári szám: 87.2.1. (1 egyed) *Ictalurus nebulosus pannonicus*. Poroszló, Tisza (1987. június 24.)
- PARATÍPUS leltári szám: 87.2.1. (3 egyed) *Ictalurus nebulosus pannonicus*. Poroszló, Tisza (1987. június 24.) (Minta sorozatszám: 1091/1; 1091/2; 1091/3)
- PARATÍPUS leltári szám: 87.2.1. (3 egyed) *Ictalurus nebulosus pannonicus*. Poroszló, Tisza (1987. június 24.) (Minta sorozatszám: 1090/1, 1090/2, 1090/3)
- PARATÍPUS leltári szám: 87.2.1. (6 egyed) *Ictalurus nebulosus pannonicus*. Poroszló, Tisza (1987. június 24.) (Minta sorozatszám: 1086/1, 1086/2, 1086/3, 1086/4, 1086/5, 1086/6)

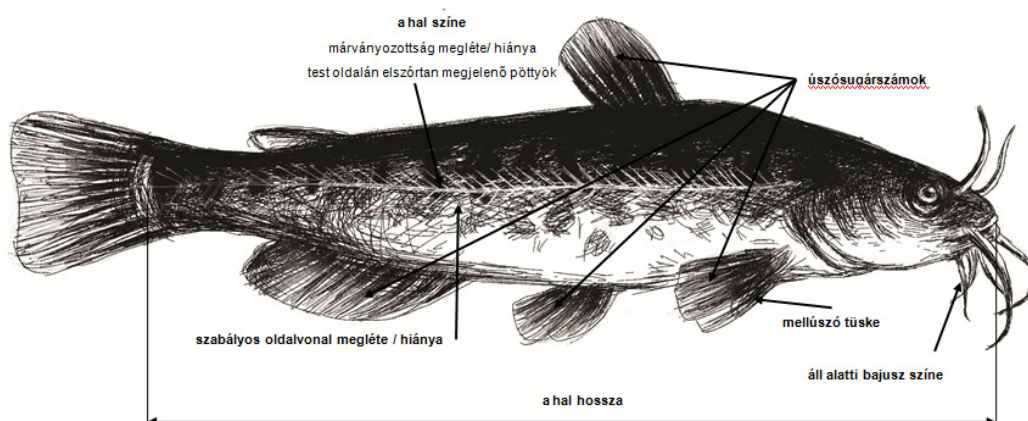
A halakból izomszövet mintákat gyűjtöttem a múzeumi személyzet felügyelete mellett. A mintákat abszolút ethanolban tároltam -20 °C-on további feldolgozásig.

5.3 Morfológiai vizsgálatok

Morfológiai vizsgálatokat a Magyarországon gyűjtött egyedeken végeztem. A Természettudományi Múzeumban tárolt típuspéldányok esetében a morfológiai vizsgálatok elvégzésére nem volt lehetőségem.

A morfológiai elemzések során megvizsgáltam azokat a paramétereket, amelyeket megkülönböztető fenotípusként írtak le korábban. Mind szubjektíven értékelhető, mind objektíven mérhető paramétereket alkalmaztam. Annak érdekében, hogy a szubjektív paraméterek egységes módon legyenek értékelve, a vizsgálatokat minden egyedem magam végeztem. Megvizsgáltam a halak testszínezetét és ennek alapján az egyedeket két kategóriába osztottam: az olíva-zöld test sárgás hassal és a szürke test fehér hassal. Megvizsgáltam a bajusz színét, az ivarukat, a test oldalán megjelenő

sötét, körülhatárolt foltok vagy pöttyök jelenlétét, a márványozottságot, illetve a szabálytalan oldalvonal előfordulását, valamint a különböző úszósugárszámokat, mint a farokúszó, hátúszó, hasúszó, és a farok alatti úszósugárszámot (8. ábra). Ezen kívül a mellúszótüskét vizsgáltam négy kategória szerint: az utolsó harmad fogazott, a középső harmad fogazott, kétharmad fogazott, a teljes hossza fogazott.



8. ábra: A megvizsgált morfológiai paraméterek: a hal test színezete, a test oldalán elszórtan megjelenő sötét pettyek megléte vagy hiánya, valamint a márványozottság előfordulása, az úszósugarak száma (a farok-, farok alatti és hátúszókban), a mellúszótüske fogazottsága, a hal hossza, az áll alatti bajusz színe. (saját ábra)

5.4 DNS-kinyerés, tárolás

A DNS-tisztítás a minta származásától és méretétől függően több módon történt, az esetek többségében az ún. sós kicsapásos (MILLER et al. 1988) technikát alkalmaztam. A módszer nagy előnye, hogy nem tartalmaz egészségre káros anyagokat, azonban a DNS-kinyerés hatékonysága alacsonyabb. Kisebb szövetmintákból, a fenol-kloroformos DNS-tisztítás (ASAHIDA et al. 1996) adott megfelelő mennyiségű, tiszta DNS-t a folyamat végére. Míg a korábban formalinnal fixált minták esetén egy erre a célra fejlesztett speciális KIT-et alkalmaztam a DNS kinyerésére.

5.4.1 DNS-preparálás sós kicsapásos módszerrel

Egy Eppendorf-cső tartó állványon az adott mintavételi helyekről kiválogatott úszókat egyenként kihelyeztem, majd jegyzőkönyvbe vettem az adott mintaszámokat és Excel táblázatban rögzítettem az adatokat.

Első lépésként az Eppendorf-csőben tárolt farokúszóból vettem kb. 1 cm²-es darabot, melyet előre felszámozott steril Eppendorf-csőbe helyeztem. A mintához 600 µl TAIL puffert adtam (8%-os SDS, TRIS, EDTA, NaCl és milli q víz keveréke), majd a szövet emésztéséhez szükséges 5 µl (20mg/ml) proteináz K enzimet adtam hozzá, ezután másfél óráig a rázó termosztát (Sartorius; Certomat BS-1) segítségével 55 °C-on 900 rpm fordulatszámon rázattam.

Amikor a minták megemésztődtek, kivettem a mixerből, és 15 percet állni hagytam szobahőmérsékleten, majd a mintákat 15 percig, szobahőmérsékleten, 14500 rpm fordulaton centrifugáltam. A megjelenő felülúszót steril 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe átpipettáztam, fontos, hogy a pipetta hegyét levágva, a DNS-t nem sértve. Ezután az átpipettázott felülúszóhoz 10 µl RNase A-t fecskendeztem, állni hagytam 20 percet. Így a mintában levő RNS teljesen felemésztődött.

A következő lépésben 300 µl túltelített (5-6 M) NaCl-ot és 30µl 7,5 M C₂H₇NO₂ (ammónium-acetát)-ot adtam a mintához. Vortex-gép segítségével összekevertem a reagenset, amíg az opálos színű, habos lett. Ezek után 3 percre betettem a centrifugába, 14500 rpm-en és szobahőmérsékleten. Steril, előkészített, előre felszámozott Eppendorf-csővekbe hűtőből kivett 400µl izo-propil alkoholt adagoltam, majd erre rámértem a fölülúszót. Átforgattam a mintákat. Ekkor már lehetett látni a kicsapódott DNS-t. Még 10 percet állni hagytam, majd 15 percig centrifugáltam őket 4 °C-on, 14500 rpm-en. A DNS mellett lévő alkoholt leöntöttem, majd 300µl 70%-os etil-alkoholban (C₂H₅OH) ismét 15 percig centrifugáltam őket 4 °C-on, 14500 rpm-en. A felülúszót leöntöttem, és a csapadékot kiszárítottam (~ 20 perc, szobahőmérsékleten), majd 50µl nagy tisztaságú vízben feloldottam. Ezt követően a DNS-t a koncentrációmérésig és a DNS hígításáig, hűtőben, -20 °C-on tároltam.

5.4.2 DNS-izolálás fenol-kloroformos eljárással

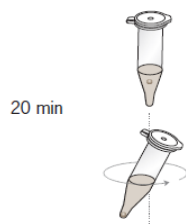
Az egyedekből nyert farokúszómintákat további felhasználásig abszolút etanolban tároltam -20 °C-on. A mintáról papírtörelő segítségével eltávolítottam az alkoholt. Az

előre elkészített steril Eppendorf-csövekbe helyeztem az egyedek úszómintáit, majd rámértem 300 μ l SET puffert (20% szacharóz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris). Ehhez hozzáadtam 5 μ l proteinázK enzimet és 55 $^{\circ}$ C-on (200 rpm) egy éjszakát rázattam. A megemésztett mintákhoz 300 μ l fenolt mértem, majd alaposan összeráztam, hogy teljesen homogén legyen, amit 4 $^{\circ}$ C-on, 10 perc centrifugálás követett (14500-15000 rpm). Vágott pipettahegy segítségével steril Eppendorf-csőbe szívtam át a fölülúszót, majd 300 μ l fenolt töltöttem hozzá. Összeráztam, 300 μ l kloroformot adtam az oldathoz. Újabb centrifugálás következett 4 $^{\circ}$ C-on, 10 percig, 15000rpm-en. A felülúszót vágott hegygel újra átszívtam, majd 300 μ l kloroformot adtam hozzá. Összeráztam és centrifugáltam 4 $^{\circ}$ C-on, 10 percig 15000 rpm-en. Steril Eppendorf-csőbe szívtam át újra a felülúszót, majd legalább két és félszeres mennyiségű jéghideg abszolút ethanollal töltöttem fel (kb.750 μ l). Nagyon óvatosan forgattam át, nehogy a kicsapódó DNS megsérüljön. Ezután 10 perc pihentetés következett szobahőmérsékleten. A végső centrifugálás 4 $^{\circ}$ C-on, 15 percig 15000 rpm-en történt. A centrifugálás után az alkoholt leöntöttem, és 300 μ l 70%-os alkohollal töltöttem fel. Ismét 15 percig centrifugáltam őket 4 $^{\circ}$ C-on, 14500 rpm-en. A felülúszót leöntöttem és a csapadékot kiszárítottam, majd 50 μ l nagy tisztaságú vízben feloldottam. Ezt követően a DNS-t a koncentrációmérésig és a DNS hígításáig, hűtőben, -20 $^{\circ}$ C-on tároltam.

5.4.3 DNS-izolálás formalin fixált múzeumi mintákból

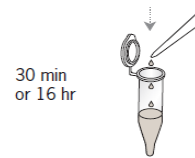
A formalinban fixált múzeumi mintákból a DNS-t egy izolációs kit (RecoverAllTM Total Nucleic Acid Isolation Kit, Applied Biosystems) segítségével próbáltam meg kinyerni. A leírásban (RECOVERAllTM 2011) használt protokoll szerint jártam el. Az alábbi, 9. ábra tartalmazza a protokoll lépéseit vázlatosan.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

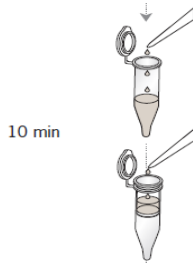
Deparafinnálás vagy rehidráció

20 min

1. az Eppendorf csövekbe belehelyezzük a tisztítandó mintákat ($\leq 80 \mu\text{m}$ vagy $\leq 35 \text{ mg}$).
2. Hozzáadunk 1 ml 100% xilolt, összekeverjük, és inkubáljuk 3 percig 50°C -on.
3. Centrifugáljuk 2 percig maximális sebességgel, és a xilolt eltávolítjuk.
4. A pelletet kétszer 1 ml 100% -os etanollal átmoszuk.
5. Vákuummal vagy levegővel megszárítjuk a pelletet, hogy maradék etanol is távozzon.

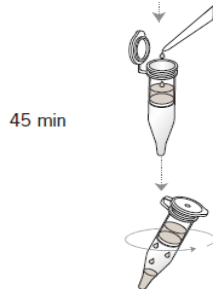
Proteáz emésztés30 min
or 16 hr

1. Hozzáadjuk az emésztési puffert és a proteázt.
2. Inkubáljuk 50°C / 80°C -on (RNS) vagy 50°C -on (DNS).

Nukleinsav izolálás

10 min

1. Elkészítjük az izolációs adalék / etanol keveréket.
2. Hozzáadjuk az izolációs adalékot / etanolt és összekeverjük.
3. Szűrőbetétten keresztül átszűrjük.
4. Átmoszuk 700 μl Wash 1-gyel.
5. Átmoszuk 500 μl Wash 2/3-mal, majd kicentrifugáljuk a maradék folyadék eltávolítása céljából.

Nukleáz emésztés és végső tisztítás

45 min

1. DNáz vagy RNáz keveréket adunk minden egyes szűrőpatronhoz, és inkubáljuk 30 percig.
2. Átmoszuk 700 μl Wash 1-gyel.
3. Kétszer átmoszuk 500 μl Wash 2/3-mal, majd centrifugáljuk a maradék folyadék eltávolítása céljából.
4. 60 μL elúciós oldattal vagy szobahőmérsékleten nem nukleázmentes vízzel (RNS) vagy 95°C (DNS) töltjük meg a csöveket.

9. ábra: A DNS izoláló (a RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit) kithoz használt protokoll (saját szerkesztés az eredeti protokoll ábráival).

5.5 A fajspecifikus genetikai markerek azonosítása

A mitokondriális szekvencia vizsgálatok során és annak előkészítésekor több különböző irodalomban leírt primer párt teszteltem a fajokon (IVANOVA et al. 2007, XIAO et al. 2001, BOTTERO et al. 2007, BOTTERO et al. 2003, JONDEUNG et al. 2007, PALUMBI 1996). Ennek során, több extrém, vagy

„megengedő” PCR körülményt is kipróbáltam annak érdekében, hogy megfelelő eredményt kapjak.

Az egyik ilyen kevésbé specifikus PCR körülmény esetén egy, a Cítokróm b-specifikus primerpárral (CytB_L_14724F és Cytbasa_R, 7. táblázat) a várt DNS-fragment mellett egy nem várt PCR termék is amplifikálódott az *A. nebulosus*-ból és *A. melas*-ból (10. ábra).

A fragmentek mérete különböző volt a két fajban, így alkalmasak voltak a fajspecifikus genetikai markerek kifejlesztésére.

Az amplifikációkat 50 µl reakcióelegyben végeztem, amely tartalmazott 1x reakció puffert (Fermentase) 0,4 mM dNTP-t, 0,25 µM primert, 1,5 mM MgCl₂-t, 1 egység (U) Taq polimerázt és 200 ng templát DNS-t.

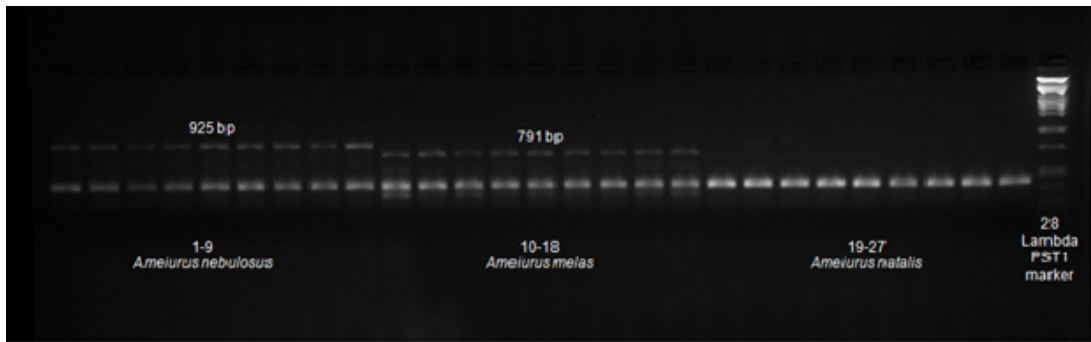
A PCR-profil: 1 perc 94 °C-os kezdeti denaturálás, 12 ciklus előszorozás (denaturálás 94 °C-on 20 másodpercig, primer feltapadás 50 °C-on és lánchosszabítás 68 °C-on 9 percen át) és 21 ciklus amplifikáció (denaturáció 94 °C-on 20 másodpercig, primer feltapadás 50 °C-on, és lánchosszabítás 68 °C-on 9 perc + 15 másodperc/ciklus). A végső lánchosszabítást 72 °C-on 5 percig végeztem.

A PCR-termék kimutatásához 1,5% agaróz gélelektroforézist használtam (120 V; 102 mA), 0,5 µg/ml etidium-bromid hozzáadásával, TBE pufferben. A kapott mintázatokat UV-lámpa alatt fényképeztem és vizuálisan elemeztem.

Az amplifikált „extra” fragmenteket kivágtam az agaróz gélből, és a QIA Quick Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével izoláltam, a gyártó ajánlásainak megfelelően.

Mindegyik fragmenst pGEM T Easy plazmid vektorba ligáltam pGEM T Easy Vector System alkalmazásával (Promega), majd XL1 Blue E. coli sejtekbe (Stratagene) transzformáltam.

Mindkét faj mintáiból 16-16 megfelelő méretű inserteket tartalmazó klónt, szekvenáltam mindkét szálon, a későbbiekben leírt szekvenálási módszer szerint a vektoron tapadó T7 és SP6 primerek segítségével. A primer szekvenciák a 7. táblázatban találhatóak.



10. ábra: _A CytB_L_14724F és Cytbasa_R primerek fajspecifikus fragmentmintázata. 1-9. *A. nebulosus*; 10-18 *A. melas*, 19-27 *A. natalis*; 28. molekulásúly marker.

5.6 Multiplex PCR-reakció a fajok azonosításához

Az *A. nebulosus*, *A. melas* és hibridjeik azonosítására specifikus multiplex és triplex PCR-reakciókat hoztam létre és optimalizáltam, HENEGARIU et al. (1997) módszerével.

A korábban meghatározott fajspecifikus szekvenciák alapján egy fajspecifikus primerpárt (Neb_F, Neb_R, 7. táblázat) terveztem Primer Express 3.0.1-vel. (ABI), amely minden egyedben csak egy, azonban a két fajban különböző méretű genomiális fragmentet sokszoroz fel. Emellett felhasználtam egy kontroll (P5 és 16sarL 59; 7 táblázat) primerpárt (amely a mitokondriális 16s gén egy szakaszát amplifikálja fel) a multiplex reakció létrehozásához.

A lánchosszabbító vagy anneálási hőmérsékletet, a lánchosszabítás időtartamát, valamint az adalékanyagok koncentrációját és a primerek mennyiségét mindaddig változtattam, amíg mind a három termékből (az *A. nebulosus* és az *A. melas* és ezek kevert DNS-éből) megfelelő eredményt nem kaptam.

A multiplex PCR-reakció optimális master keveréke: 1x reakciópuffer (Fermentase); 0,4 mM dNTP; 90 pM P5 és 16sarL 59 primerek és 125 pMNeb_F és Neb_R primerek; 1,5 mM MgCl₂; 0,1% Tween20; 4% dimetil-szulfoxid; 0,375 ng szarvasmarha-szérum albumin (BSA); 1,5 U Taq polimeráz és 40 ng templát DNS 15 µl végtérfogatban.

A multiplex amplifikációhoz az optimális körülmények a következők: preamplifikációs denaturálás 95 °C-on 10 percig, majd 2 ciklus 95 °C-on 15 s, 56 °C 60 másodperc és 72 °C 140 s, majd 35 ciklus 95 °C-on 15 s, 56 °C-on 20 másodpercig és 72 °C-on 2 percen keresztül, majd végső lánchosszabbítást 72 °C-on 5 percen keresztül. A reakció körülmények biztosításához Mastercycler Gradients

(Eppendorf) PCR-készüléket alkalmaztam. A termékeket gélelektroforézises technikával elválasztottam és elemeztem a fent leírt módon.

7. táblázat: A kísérletekben alkalmazott primerek és az amplifikált termékek méretei.

Primer neve	Szekvencia	Szekvencia mérete	Hivatkozások
FF2d	TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG	708bp	IVANOVA et al. 2007
FR1d	CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARA A		
CytB_L_14724F	GACTTGAAAACCCACCGTTG	<i>A. nebulosus</i> 927bp	XIAO et al. 2001
Cytbasa_R	GAAGGCGGTCATCATAACTAG	<i>A. melas</i> 793bp minden faj 421bp	BOTTERO et al. 2007
Neb_F	CTGCTACATGCTAAGGCTAACG	<i>A. nebulosus</i> 591bp	jelen kutatómunka
Neb_R	GGATTATTGTGGCGATTGGT	<i>A. melas</i> 457bp	jelen kutatómunka
P5	CCGAACTTAAGTTATAGCTGGTTGC	1175bp	JONDEUNG et al. 2007
16sarL_59	CGCCTGTTTATCAAAAACAT		PALUMBI 1996
New-Sp6	AGCTATTTAGGTGACACTATAG	seq	IRWIN és KAAREN 2001
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	seq	

5.7 Mitokondriális DNS-analízis

Az univerzális FF2d és FR1d primereket (IVANOVA et al. 2007) választottam ki a mitokondriális szekvenciaalapú faj azonosítására. Ezek a primerek amplifikálják a citokróm oxidáz I gén (COI) 708 bp hosszúságú szakaszát (7. táblázat, 10. ábra).

Az amplifikációt 50 µl reakciótérfogatban végeztem, amely 1x reakciópuffert (Fermentase) tartalmazott, 0,4 mM dNTP-t, 0,250 µM forward és reverse primert, 1,5 mM MgCl₂-t, 1 U Taq-polimerázt és 200 ng-es DNS-templátot.

A alkalmazott PCR-profil kezdeti denaturációt (1 percig 94 °C-on), 37 ciklusban ismételt amplifikációt (denaturálás 94 °C-on 15 másodpercig, feltapadás 55 °C-on 20 másodpercig és lánchosszabbítás 72 °C-on 2 percig) és végső lánchosszabbítást (72 °C-on 5 percig) tartalmazott. A PCR-termékeket 1,5% -os agaróz gélelektroforézissel vizsgáltam és megszekvenáltam.

5.8 PCR-termékek szekvencia meghatározása

A PCR-amplifikált mitokondriális COI fragmenseket és fajspecifikus fragmenteket tartalmazó plazmidokat NucleoSpin Gel és PCR Clean up (Macherey-Nagel), valamint a nagy sebességű plazmid mini (Geneaid) kitekkel tisztítottam, mielőtt a szekvenálásra sor került volna. A szekvenálást BigDye® Terminator szekvenáló KIT-tel (ABI) végeztem el. A reakció összetétele: (a reakciót 0,2 ml-es PCR csőbe végeztük) 1µl szekvenáló puffer, 1µl primer (FF2d, FR1d, T7, vagy SP6 a templáttól függően), 2 µl PCR termék (~200ng DNS), 1 µl BigDye® Terminator v3.1 Sequencing mix (Cat. num.:4336935).

A alkalmazott PCR-profil, kezdeti denaturációt (5 perc 96 °C-on), 55 ciklusban ismételt amplifikációt (denaturálás 96 °C-on 30 másodpercig, feltapadás 55 °C-on 20 másodpercig és lánchosszabbítás 60 °C-on 4 percig) és végső inkubálást (4 °C-on a további feldolgozásig) tartalmazott.

Ezt követően az 5 µl térfogatú reakció elegyhez hozzáadtam 80 µl acetát mixet (3 µl 3mM nátrium-acetát, 62,50 µl tömény ethanol, 14,50 µl MQ víz), és Vortex-szel összekevertem. 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezután kilendülő fejes centrifuga rotorban, 4600 rpm-en 20 percig centrifugáltam. A felülúszót leöntöttem a PCR csőből, majd hozzáadtam 180 µl 70 %-os ethanolt, összeráztam és ismét 20 percig 4600 rpm-en centrifugáltam. A felülúszó ismételt eltávolítása után a csöveket fejjel lefelé alacsony fordulaton centrifugáltam (1000 rpm) 1 percig, hogy a pellet száradását elősegítsem. Végül hozzáadtam 10,00 µl Hi-Di Formamid-ot (Applied Biosystems), hogy feloldjam a szemmel nemlátható csapadékot, majd 4 °C-on inkubáltam egy éjszakán keresztül. A kapilláris elektroforézis során végzett szekvencia meghatározás előtt a mintákat denaturáltam 98 °C-on 6 percig, majd jégre helyeztem.

A szekvenciákat ABI Prism 3130 (ABI) szekvenáló segítségével határoztam meg POP7 polimer és 50cm-es kapilláris felhasználásával. A szekvenciákat a FinchTV 1.4 (WEB 5.), Mega5 (TAMURA et al. 2011) vagy CLUSTAL 2.1 (LARKIN et al. 2007) szoftver segítségével elemeztem, illetve BLAST-analízissel hasonlítottam össze az NCBI, GenBank adatbázisában található szekvenciákkal.

5.9 Az eredmények statisztikai elemzése

A morfológiai eredmények statisztikai értékeléséhez egyutas variacionális (Anova) analízist végeztem Tukey-tesztel (HUZSVAI és VINCZE 2012, EVANS 1983).

A főkomponens-analízis vagy főkomponens-elemzés (PCA) célja elsősorban az adatok csökkentése és azok összegzése. A vizsgálat megkezdésekor még nagyon sok a változó, amelyek egymással korrelálnak, ezek számát szeretnénk csökkenteni ezzel a módszerrel. Tehát az egymással esetlegesen korreláló változókat kevesebb számú nem korreláló komponensekbe redukálja. A csoportosan korreláló változók pedig a főkomponenseket alakítják ki.

A korreláció kiszámításához, a morfológiai paraméterek és a genotípus (WESSA 2015) közötti korreláció p értékéhez *PCAGEN 1.2.1* szoftvert használtam.

5.10 Etikai nyilatkozat

Minden vizsgálatot a Fővárosi és Pest Megyei Kormányhivatal *Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága* a Nemzeti *Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal* (NÉBIH) hagyott jóvá, melynek engedély száma: 22.1/527/003/2008&XIV-I-001/2302-4/2012.

6. EREDMÉNYEK

6.1 Új fajspecifikus genomikai DNS-markerek azonosítása és jellemzése az *A. melas*-ból és az *A. nebulosus*-ból

Az optimalizáláskor tesztelt egyik primer pár (CytB_L_14724F és Cytbasa_R (7. táblázat)) egy halványabb fajspecifikus extra fragmentet is felszorzott a várt fragment mellett az *A. nebulosus* és *A. melas* egyedekből, míg csak a várt Cytocrom-b specifikus fragmentet kaptam az *A. natalis* mintákból (13. ábra).

```

A. nebulosus TGACTTGAAACCCACCGTTGGCCAGATTAGCAGCAGCTAGCTGTTCATCGCGGGAAGAG 60
A. melas TGACTTGAAACCCACCGTTGGCCAGATTAGCAGCAGCTAGCTGTTCATCGCGGGAAGAG 60

A. nebulosus CTGTAAAGTCAGAGTCCTAAATGATAAACGCCGGGTAGGAAACATCTAGAAATGAGCCTC 120
A. melas CTGTAAAGTCAGAGTCCTAAATGATAAACGCCGGGTAGGAAACATCTAGAAATGAGCCTC 120

A. nebulosus CGCTTAGTAAACGAACAGCGGTGAAATCCAGTTCGGCACCGCTGCTACATGCTAAGGCT 180
A. melas CGCTTAGTAAACGAACAGCGGTGAAATCCAGTTCGGCACCGCTGCTACATGCTAAGGCT 180

A. nebulosus AACGCTTTAACTTCGAGTCGACAGAAAGCATGTGCGTAGACGGAGAGTCGGCCAGTGCG 240
A. melas AACGCTTTAACTTCGAGTCGACAGAAAGCATGTGCGTAGACGGAGAGTCGGCCAGTGCG 240

A. nebulosus CATGCGCAGTCATTGGCAACCTTTATTGACGCCAAGGCACGCGCCAATAATTCACATA 300
A. melas CATGCGCAGTCCTTTGGCAACCTTTATTGACGCCAAGGCACGCGCCAATAATTCACATA 300

A. nebulosus TACACGTCAGTAGGAGCGACTGGTCCATACAGGTGGAGCCCCCCCCCGTAATTTAATT 360
A. melas TACACGTCAGTAGGAGCGACTGGTCCATACAGTGGG-----CCCCTG----- 343

A. nebulosus AAAAAAGTAGAACTTTCCCTTTATGTATACTTTATGGAGTTACAGACACTTCCCCTTA 420
A. melas -----

A. nebulosus ATTTTTTTTGTGCTTGTTCICGGGTTTTATAATAATTTATGTAACCAGCGACAGTTATTGA 480
A. melas -----TTGTGCTTGTTCICGGGTTTTATAATAATTTATGTAACCAGCGACAGTTATTGA 396

A. nebulosus GTAGCCTTGATGGGCAGGGGGTGGGGTTTGGTACTTTTAAATTTGGTTCCTTTATTAG 540
A. melas GTAGCCTTGATGGGCAGGGGGTGGGGTTTGGTACTTTTAAATTTGGTTCCTTTGTAAG 456

A. nebulosus TATAACAAGAAAAAAGGCCGTGAATGTTGCTCAGTTTTTTTTTTGTTGTTTTTTTCTTC 600
A. melas TATAACAAG-----ATGTTTTTTTCTTC 480

A. nebulosus TTCTAAATGAAATATTTGGGAGGGGGATGGGAGGAAAGAGAGAAAGGTAATGAATCA 660
A. melas TTCTAAATGAAATATTTGGGAGGGGGATGGGAGGAAACAAGATAAAAG----- 528

A. nebulosus CATGTAAATGAATCACAGGTAAATGAATCCATCCATCCATTCCTGTAATATCATGCCAGC 720
A. melas ---GTCAATGAATCACAGGTAAATGAATCCATCCATCCATTCCTGTAATATCATGCCAGC 585

A. nebulosus CGTCACTGCTGTACCAATCGCCACAATAATCCCAATCACGTGCAATAAATCAGTAATTAA 780
A. melas CGTCACTGCTGTACCAATCGCCACAATAATCCCAATCACGTGCAATAAATCAGTAATTAA 645

A. nebulosus ATATGATACAACCTCGTTAAGCATCATAATGTCCTTTTTATTAGAATACATATTACTCCA 840
A. melas ATATGATACAACCTCGTTAAGCATCATAATGTCCTTTTTATTAGAATACATATTACTCCA 705

A. nebulosus AAGGCCTCTCTT-----AAAAAGAAAGAAAGAAAAAACAACATAGCCTTTATCAGCGACAAG 899
A. melas AAGGCCACTTTTTAAAAAGAAAGAAAGAAAAAACAACATAGCCTTTATCAGCGACAAG 765

A. nebulosus CTTATCTAGTTAIGATGACCGCCTCA 925
A. melas CTTATCTAGTTAIGATGACCGCCTCA 791

```

11. ábra: *A. nebulosus* és *A. melas* fajspecifikus szekvenciák illesztése, CLUSTAL 2.1 (LARKIN et al. 2007).

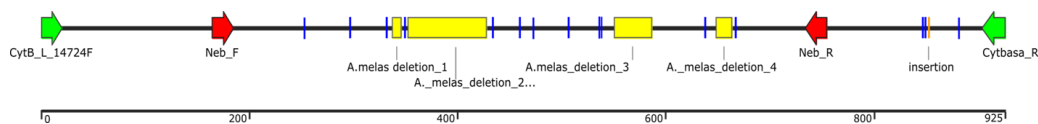
A két "extra fragment" az összes eredeti élőhelyről származó minta esetében (20 barna és fekete törpeharcsa kontroll) jelen volt, és nem mutattak ellentmondást a két faj egyetlen egyedének mintájában sem (13. ábra).

A két fajspecifikus fragment teljes hosszúságú nukleotidszekvenciája meghatározásra és Génbankban elhelyezésre került (génbanki azonosítói: *A. nebulosus*: KX943306, *A. melas*: KX943305).

Az *A. nebulosus* szekvencia hossza 925 bp (KX943306), míg az *A. melas* 791 bp (KX943305) volt.

Ez utóbbi tartalmazott egy 7bp-, egy 77bp-, egy 36bp- és egy 15 bp hosszú deléciót, valamint 14 egybázisos szubsztitúciót és egy 1 bázis hosszúságú inszerciót az *A. nebulosus* szekvenciához (11. ábra és 12. ábra) képest.

Az AT / (AT + GC) arány kb. 57% mindkét szekvenciában (11. ábra). A két szekvencia illesztése magas homológiát mutatott a méretkülönbség ellenére.



12. ábra: Az *A. nebulosus* és az *A. melas* fajspecifikus szekvenciáinak összehasonlítása. A zöld nyilak az eredeti oligonukleotidok. A sárga téglalapok az *A. melas* szekvenciában lévő deléciókat mutatják, a kék téglalapok egybázisú helyettesítések, a narancssárga téglalap mutatja az 1 bp inszerciót. A piros nyilak specifikus primerek, amelyeket a fajazonosító multiplex PCR-ekhez használtam.

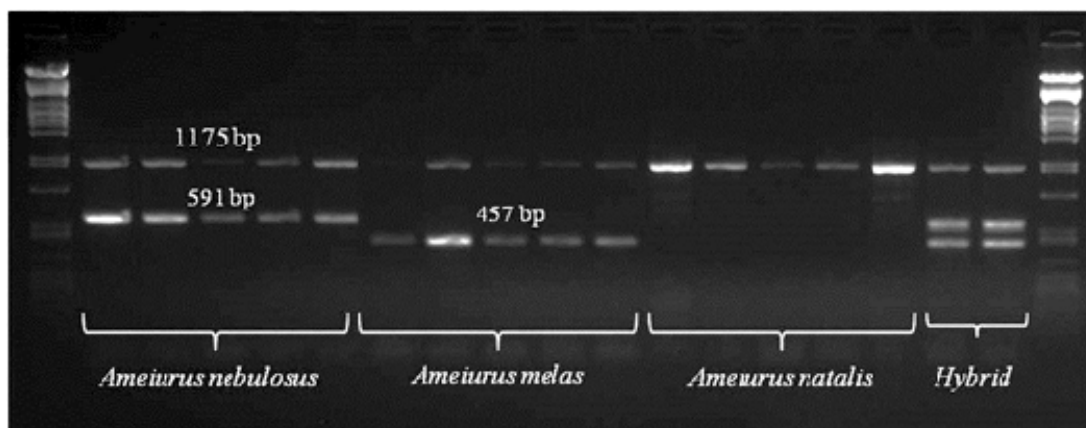
A DNS szintjén egyik marker sem mutatott szignifikáns homológiát a GenBank ismert szekvenciáival.

Fehérje szinten mindkét szekvencia (147-320 bp régió) gyenge homológiát mutatott (36% -os homológia) a cecelég (*Glossina morsitans*) glutation-S-transzferázzal és a *Rhodnius prolixus* rovar (689-796 bp régió, 33% -os homológia) feltételezett spermidin fehérjéjével (ALVES-SILVA et al. 2010, RIBEIRO et al. 2014).

6.2 Az *A.melas*, az *A.nebulosus* és hibridjeik azonosítására szolgáló PCR-alapú marker-teszt kidolgozása

A két faj pontosabb azonosításához és hibridek azonosításához új primer párt fejlesztettem ki (Neb_F és Neb_R, 7. táblázat) a két fajspecifikus szekvencia konszenzus részéhez (12. ábra).

Ez a primer pár az *A. nebulosus*-ból és az *A. melas*-ból származó 457 bp hosszúságú 591 bp hosszú fragmentet amplifikálta. Ezen kívül mindkét fragment a hibrid genomokból is kimutatható (13. ábra).



13. ábra: A törpeharcsa fajok azonosítására kifejlesztett multiplex PCR-reakció, amely az eredeti, alacsony hatékonyságú adaptált PCR-reakciónál sokkal hatékonyabb kimutatást tesz lehetővé. Az első és az utolsó sáv Lambda PstI molekulásúly-marker.

A specifikus markerek mellett számos mitokondriális primert teszteltem a multiplex PCR lehetséges kontrolljainak. Végül két primert választottam (P5 és 16sarL 59 primerek, 7. táblázat), amelyek amplifikálták a 16s gén egy 1,175 bp hosszú fragmensét.

Az optimalizált multiplex PCR két fragmentet adott a „tiszta vérű” fekete- és barna törpeharcsa egyedek mintáiból és hármat a hibridjeikből származó mintákból, míg a sárga törpeharcsa egyedekből csak a kontrollfragment volt kimutatható. Ezt azonban magyarországi körülmények között nem lehetett tesztelni, mivel nem találtam sárga törpeharcsa egyedeket.

6.3 A magyar törpeharcsák elterjedésének és hibridizációjának vizsgálata multiplex genomikai teszttel és mitokondriális genotípusokkal

Az összes rendelkezésre álló 466 mintát vizsgáltam a kidolgozott multiplex PCR-teszttel. Az eredmények szerint 426 példány volt *A. melas*, 37 példány *A. nebulosus*, míg csak két minta származott hibrid egyedből. A fekete törpeharcsa minden élőhelyen jelen volt, de a barna törpeharcsa-specifikus fragmentet csak a vajai (19 példány) és tőserdői (19 minta) élőhelyekről származó mintákban találtam meg. Emellett a hibrid genotípus (három fragment) csak a Tőserdőből származó két mintában volt jelen (8., 9. táblázat).

8. táblázat: A genomikus és mitokondriális genotipizálás összesített adatai a különböző vízgyűjtő területeken.

Mintavételi helyek		Genotípus					Mitokondriális és genomialis genotípus ellentmondás
		Genomi DNS			Mitokondriális		
		A. nebulosus	A. melas	Hibrid	A. nebulosus	A. melas	
1.	Adácsi-tó	-	56	-	-	16	-
2.	Pilisvörösvári tó'	-	13	-	-	7	-
3.	Hármas-Körös folyó (Gyomaendrőd)	-	8	-	-	8	-
4.	Jászsági-csatorna	-	6	-	1	5	1
5.	Kettős-Körös folyó (Békéscsaba)	-	11	-	-	9	-
6.	Körös folyó (Dénesmajor),	-	114	-	-	29	-
7.	Dráva folyó (Pécs-Majláthpuszta)	-	52	-	-	14	-
8.	Lőrinci-tó (Hatvan)	-	51	-	-	15	-
9.	Külső-Béda-tó (Mohács)	-	30	-	-	11	-
10.	Vaja-tó	19	56	-	18	17	-
11.	Szikra-holtág (Tőserdő)	19	29	2	20	7	1

9. táblázat: A töserdői élőhelyen megtalálható három genotípus morfológiai adatainak összehasonlítása.

Genotípus	Bajusz színe		színezettség		Márványozottság		Foltozottság		Oldalvonal megléte		Úszósugárszámok		
	Sötét	Világos	olívazöld	szürke	látszik	nem látszik	látszik	nem látszik	szabályos	szabálytalan	Farokúszósugár szám	Farok alatti úszósugárszám	Hátúszósugárszám
	Egyedszám									Átlag±szórás			
<i>A. melas</i>	15	13	28	0	0	28	0	28	28	0	20±0.6	20±0.8	7±0.2
<i>A. nebulosus</i>	16	2	0	18	18	0	0	18	18	0	20±1	20±0.6	7±0.5
hibrid	3	0	2	1	3	0	0	3	3	0	19±0.6	20±0.6	7

A multiplex PCR-teszt és a mitokondriális genom szekvenálás eredményeit egyedenként összehasonlítva két hibrid *A. nebulosus* mitokondriális genotípust mutatott, míg a szikrai víztározóból származó egyik mintában barna törpeharcsa genomialis és fekete törpeharcsa mitokondriális DNS volt, míg egy a Jászsági-csatorna ennek ellentétes kombinációja volt (fekete törpeharcsa genomikus és barna törpeharcsa mitokondriális DNS) megtalálható.

6.4 A törpeharcsák COI mitokondriális szekvenanciaanalízise

A fajok azonosításához mitokondriális szekvenanciaanalízist végeztem. Ezek során meghatároztam a Cytochrome Oxidase I (COI) gén azon szakaszát, amelyet a Barcoding programban a fajok azonosításához használnak (KOCHZIUS et al. 2010, WARD et al. 2005).

Az alkalmazott univerzális oligók (FF2d, FR1d, 7. táblázat) jól működtek a vizsgált *Ameiurus* fajokban, és a kívánt méretű (708 bp) fragmentumokat amplifikáltak.

Meghatároztam a rendelkezésre álló minták legalább 25% -ának szekvenciáját minden egyes élőhelyről. Ezt kiegészítettem azokkal a mintákkal, amelyek az *A. nebulosus* genom jelenlétét mutatták a későbbi genomi DNS-vizsgálatok során,

valamint azokkal, amelyeket a színezetük alapján egyértelműen fekete törpeharcsaként azonosítottam (az élőhelyenként meghatározott szekvenciák számát a 8. táblázat mutatja).

Összesen 176 egyed mitokondriális COI szekvenciáját elemeztem, valamint három mintát minden fajból az amerikai kontroll mintákból. Az Észak-Amerikából származó kontrollminták szekvenciái a BLAST eredmények alapján 100% -ban azonosak voltak a Gene Bank *A. melas*, *A. nebulosus* és *A. natalis* szekvenciáival.

10. táblázat: A különböző mintavételi helyekből származó meghatározott mitokondriális (COI) szekvenciák száma és százalékos aránya.

Mintavételi helyek	Mitokondriális (COI) szekvenciák (db)	%-ban szekvenált egyedek (db)
Dráva folyó (Majláthpuszta)	14	27
Körös folyó (Gyomaendrőd)	8	100
Szikra-holtág(Tőserdő)	27	54
Vaja-tó (ösláp)	35	47
Pilisvörösvári-tó	7	54
Adácsi-tó (Zagyva)	15	27
Körös folyó (Dénesmajor)	28	25
Jászsági-csatorna (Tisza)	6	100
Kettős-Körös folyó (Békéscsaba)	9	82
Lőrinci-tó Hatvan (Zagyva)	15	29
Külső-Béda-tó Mohács (Duna)	11	37
Összesített adatok	175	38

Vizsgálataim során 138 magyarországi egyed hordozott *A. melas* mitokondriális szekvenciát (Génbanki azonosítói: KX909375–KX909513). Ezek között csak három haplotípus volt megtalálható, amelyek csak néhány nukleotidban különböztek). Három egyedben, egy Adácsról származó (Génbanki azonosító: KX909378), egy a Kettős-Körös békéscsabai szakaszáról származó (Génbanki azonosító: KX909397) és egy a Lőrinci tóból származó (Génbanki azonosító: KX909444) egyedben az 50. nukleotid pozícióban „C” található „T” helyett és a 168. pozícióban „G” van „A” helyett, míg egy másik békéscsabai minta esetén (Génbanki azonosító: KX909394) a 274. nukleotid pozícióban guanin volt adenin helyett. Ez utóbbi haplotípus csak egy egyedben volt jelen. Az *A. melas* fajt minden élőhelyen azonosítottam.

Csak 37 vizsgált szekvencia (22,2%) származott az *A. nebulosus*-ból (Génbanki azonosítói: KX909514 - KX909551), és mindegyik szekvencia ugyanabból a haplotípusból származott. Ez a mitokondriális genom csak három élőhelyen: a

Jászsgai-csatornában (1 mintában), Vaján (18 mintában) és a Szikra-víztározóban (20 példányban) volt megtalálható.

6.5 A múzeumi példányok genetikai vizsgálata

A Magyar Természettudományi Múzeum, Budapesten őrzi azokat az 1990-ben begyűjtött egyedeket, amelyeket HARKA Ákos és PINTÉR Károly vizsgált meg és írt le egy új, hibrid alfajként. Ebben a tanulmányban írják le először, morfológiai bélyegek alapján a tényt, hogy Magyarországon a két faj (*A.melas* és *A. nebulosus*) hibridizál (HARKA és PINTÉR 1990). A kifejlesztett új multiplex PCR-alapú módszerrel vizsgáltam az alfaj leírása során gyűjtött egyedeket, mely genetikai bizonyítékot szolgáltatathat és alátámaszthatja a korábbi vizsgálatok során megfigyelt hibridizációt.

A formalinban fixált mintákból a DNS kinyerése bonyolult és nehézkes, a kinyerhető DNS mennyisége kevés, töredezett és rossz minőségű volt. Így a PCR tesztek eredménye nagyon gyengén, halványan rajzolódott ki a gélképen. Azonban több ismétlés után a genomiális multiplex PCR-teszt a legtöbb mintával kielégítő eredményt adott és működött. Azaz hét példányban *A. melas* specifikus markert találtam meg, míg öt példány hibrid volt a genomi DNS-tesztek szerint. Sajnos a minták nem voltak alkalmasak a mitokondriális COI gén szekvenálására, így ezekből a mintákból az anyai öröklődésű mitokondriális DNS eredetét nem tudtam megvizsgálni.

6.6 A morfológiai vizsgálatok eredménye

Morfológiai vizsgálatok alapján az **adácsi** élőhelyen az olajzöld színezetű megjelenés miatt az 56 egyedből 46 esetben a hibridek jelenlétét feltételeztem. Hét egyed az *A. melas*, míg 3 egyed az *A. nebulosus* fenotípusos jegyeit hordozta. Ezzel szemben a Multiplex PCR vizsgálatok mind az 56 esetben az *A. melas* *genotípus jelenlétét igazolták*. A mitokondriális vizsgálatok során 15 egyed szekvenálását követően 100%-ban az *A.melas* jelenlétét igazoltam. Az ivar kiegyensúlyozott volt: az egyedek 55 %-a (31 egyed) volt ikrás és 45%-a, (25 egyed) volt tejes.

A **pilisvörösvári** élőhelyen a vizsgált 13 egyednél fenotípusosan ellentmondásos eredményeket kaptam. A színezet hibrid egyedekre utalt, habár a fark alatti úszósugárszám ellentmondott ennek, mert átlagosan (szórással) $18 \pm 0,78$ volt. Ez a szám alacsonyabb volt, mint a szerzők által a hibridről megállapított 19-21-es úszósugárszám (HARKA és PINTÉR 1990). Az egyedek genotípusa multiplex PCR-vizsgálat után egyértelműen *A.melas* faj volt, amit 7 egyed esetében igazolt a

szekvenálás is. Az ivar alakulása szintén kiegyensúlyozott volt: 5 egyed (38%) ikrás, 8 egyed (62%) tejes volt.

A **gyomaendrődi** élőhelyen 8 egyed vizsgálata során fenotípusosan 6 egyedet *A. nebulosus*-hoz, 1 egyedet az *A. melas* fajba soroltam be és 1 egyedet hibridként jegyeztem fel. Multiplex PCR igazolta 100%-ban az *A. melas* jelenlétét, amit mind a 8 esetben alátámasztott a szekvenálás is. Az analízis úszósugárszám itt átlagosan 18 volt \pm 1,06 szórással. Az ivar alakulása kiegyensúlyozott 50-50%-ban jelent meg.

A **Jászágó-csatornán** 6 egyedből 5-nél fenotípusosan *A. melas* besorolást állapítottam meg és egy esetben feltételeztem a hibrid jelenlétét. Az analízis úszósugárszám átlaga szórással $20 \pm 0,84$ volt, ami megfelel mind az *A. melas*, mind az *A. nebulosus*, mind a hibrid besorolásához. Multiplex PCR után 6 egyed az *A. melas* fajhoz tartozó 2 fragmentet adott, míg a szekvenálás során 1 egyed az *A. nebulosus*-hoz tartozó mitokondriális fragmenttel rendelkezett. Az ivararány itt szintén kiegyensúlyozott volt 50-50%-os arányban.

A **békéscsabai** élőhelyen 11 egyedből 11 egyedet *A. melas*-ként feltételeztem. Az analízis úszósugárszám átlaga $18 (\pm 0,82)$ -nek adódott. Ami viszonylag alacsony, ezért is a *melas* besorolás. A multiplex PCR *A. melas* jelenlétét mutatta és a 9 egyed szekvenciája is az *A. melas* genotípust erősítette meg. Az ivararány feltételezhetően az alacsony mintaszám miatt nem volt kiegyensúlyozott. 7 ikrás (64%) és 4 tejes (36%) volt a vizsgált állományban.

Dénesmajorból származó 114 vizsgált egyedből fenotípusosan 112 egyedet *A. melas* fajhoz és 2 egyedet hibridként soroltam be. Az analízis úszósugárszám szintén alacsony volt átlag szórással együtt $18 \pm 1,02$. A multiplex PCR egyértelműen az *A. melas* jelenlétét igazolta és 28 egyed mitokondriális szekvenciái is az *A. melas* jelenlétét erősítették meg. Az ivararány minimálisan a tejesek irányába mozdult el: 61 tejes (54%) és 53 ikrás (46%) egyedet vizsgáltam.

Pécs-Dráva esetében 52 egyedet vizsgáltam. Ebből 48-at *A. melas*-nak, 4-et hibridnek feltételeztem. Az analízis úszósugárszám átlag szórással $20 \pm 0,87$ volt. A multiplex PCR 100%-ban az *A. melas* jelenlétét igazolta, és 14 egyed esetén a szekvenálás vizsgálat is. Az ivararány kiegyensúlyozott volt (*11. táblázat*).

A **Lőrinci-tóból (Hatvan)** 51 egyedet vizsgáltam. Ebből 50 egyed a hibridekre jellemző fenotípusos bélyegeket mutatott és 1 egyed *A. melas* fenotípusú volt. Az analízis úszósugárszám $19 \pm 0,85$ volt. A multiplex PCR is és a szekvenálások is 100%-an az *A. melas* jelenlétét igazolták. Az ivararány kiegyensúlyozott volt (*11. táblázat*).

Mohács Külső-Bédából befogott 30 példányból 23 egyed hibrid, 4 egyed *A. nebulosus* és 3 egyed *A. melas* fenotípusú volt. Az analízis, fark alatti úszósugárszám

$20 \pm 1,07$ volt. Multiplex PCR 100%-ban az *A.melast* mutatta ki és a 11 egyed szekvenálása is ezt igazolta. Az ivararány kiegyensúlyozott volt (11. táblázat).

Vaja volt az egyik olyan élőhely, ahol a többi élőhelyhez viszonyítva kifejezettebben jelent meg az *A. nebulosus* fajra jellemző márványozottság és az úszók, úszóhárttyák világos színe is. 75 vizsgált egyedből fenotípusosan 18 egyedet soroltam az *A. nebulosus* egyedek közé ($19 \pm 0,97$ átlag anális úszósugárszám mellett) és 57 egyedet az *A. melas* ($20 \pm 1,20$ anális átlag úszósugárszám) egyedek közé. Multiplex PCR-rel 19 egyed bizonyult *A. nebulosusnak*, melyet 18 egyednél a mitokondriális szekvenciák is igazoltak. 56 egyed *A. melas*, melyet mind a 17 vizsgált egyed COI-szekvenciája megerősített. Az ivararány mindkét faj esetében kiegyensúlyozott volt. Nem találtam hibridet (11. táblázat).

Tőserdő volt a másik olyan élőhely, ahol a színezetbeli különbségek erőteljesebben mutatkoztak. 50 egyedet vizsgáltam, 20 egyed ($20 \pm 0,60$ anális átlag úszósugárszám) *A. nebulosus*, 30 egyed ($20 \pm 0,83$ anális átlag úszósugárszám) *A. melas* fenotípusú volt.

11. táblázat: A vizsgált halak úszósugár számai a különböző mintavételi helyekről.

Mintavételi helyek	(n)	Úszósugárszámon (Átlag \pm szórás)			Tejes/Hím %
		Farokúszó sugárszám	Farok alatti úszósugárszám	Hátúszó sugárszám	
1. Adácsi- tó	56	$19 \pm 0,86$	$20 \pm 0,78$	$7,00 \pm 0,19$	45
2. Pilisvörösvári-tó	13	$19 \pm 0,78$	$18 \pm 0,78$	$7,00 \pm 0,00$	62
3. Hármas-Körös folyó (Gyomaendrőd),	8	$19 \pm 0,89$	$18 \pm 1,06$	$7,00 \pm 0,00$	50
4. Jászsági-csatorna	6	$20 \pm 0,84$	$20 \pm 0,84$	$7,00 \pm 0,00$	50
5. Kettős-Körös folyó (Békéscsaba)	11	$20 \pm 0,52$	$18 \pm 0,82$	$7,00 \pm 0,00$	36,00
6. Körös folyó (Dénesmajor)	114	$20 \pm 1,13$	$18 \pm 1,02$	$7,00 \pm 0,00$	54
7. Dráva folyó (Pécs-Majláthpuszta)	52	$21 \pm 1,25$	$20 \pm 0,87$	$7,00 \pm 0,00$	58
8. Lőrinci-tó (Hatvan)	51	$22 \pm 0,92$	$19 \pm 0,85$	$7,00 \pm 0,00$	39
9. Külső-Béda-tó (Mohács)	30	$21 \pm 1,17$	$20 \pm 1,07$	$7,00 \pm 0,00$	57
10. Vaja-tó	75	$21 \pm 1,01$	$20 \pm 1,13$	$7,04 \pm 0,19$	57
11. Szikra-holtág (Tőserdő)	50	$20 \pm 0,78$	$20 \pm 0,74$	$7 \pm 0,32$	40

A multiplex PCR általában alátámasztotta a fenotípusos besorolást, ám 2 egyed esetében a hibridekre jellemző három fragment sokszorozódott fel a PCR reakcióban, és a mitokondriális szekvencia vizsgálatok egy *A. melas* nukleáris genomú egyednél *A. nebulosus* mitokondriális genom jelenlétét igazolták. A fark alatti úszósugárszám átlagosan $20 \pm 0,58$ volt. Az ivararány a fajok esetében kiegyenlített volt (11. táblázat).

12 táblázat: A vizsgált halak egyes merisztikus bélyegei a különböző mintavételi helyeken.

Mintavételi helyek	Egyedszám	Test és a has színezete		Áll alatti bajusz színe			Pöttözőfttség megléte		Márványozottság megléte		Mellúszótüske fogazottsága (1-4)				Oldalvonal				
		Olíva zöld test, sárgás színű hassal	Szürke testszín fehér hassal	Fekete	Sötét	Világos	Igen	Nem	Igen	Nem	1	2	3	4	Szabályos	Szabálytalan			
Adácsi tó	56	56		7	17	32	12	44		56		1	4	1	5	2	7	46	10
Hármas-Körös folyó (Gyomaendrőd)	8	8			1	7		8		8		1	1	1	6	8			
Pilisvörösvári-tó	13	13			1	12		13		13		3	4	6	1	12			
Dénesmajor Fehér-Körös	114	114		18	69	27	1	113		114	4	1	4	1	0	5	11	4	
Jászsági-csatorna	6		6	4	1	1	6			6				6	6				
Kettős Körös folyó (Békéscsaba)	11	11			6	5		11		11			1	1			11		
Dráva folyó (Majláthpuszta)	52	52		37	7	8	3	49		52		6		4	6	52			
Lőrinci-tó (Hatvan)	51	51		20	4	27	21	30		51	4			4	7	49	2		
Külső-Béda-tó (Mohács)	30	28	2	11	2	17	20	10		30		2		2	8	30			
Vajai-tó (ósláp)	75	54	21	16	49	10		75	22	53			7	5		75			
Szikra-víztározó (Tóserdő)	50	31	19		35	15		50	22	28			4	3	7	50			

Összefoglalva: a 11 magyarországi élőhelyről származó 466 egyed vizsgálva a fontosabb morfológiai paramétereket alapján végzett fajmeghatározást figyelembe véve (anális úszósugárszám, mellúszótüske fogazottsága, színezetbeli sajátosságok) és genetikai vizsgálatok alkalmazásával mindössze két élőhelyen (Vaja és Tóserdő) találtam meg egymás mellett az *A. melas* és *A. nebulosus* fajt. Közülük egy élőhelyen

(Tőserdő) 3 és egy további élőhelyen (Jászsági-csatorna) 1 genetikai hibrid egyedet azonosítottam.



14. ábra: A fekete - és a barna törpeharcsa közötti fenotípusos különbség a színezet és a márványozottság alapján (saját fotók).

6.7 A fenotípusos adatok genotípus-alapú értékelése

Az egyes egyedek genetikai faj azonosítását követően az összes vizsgált morfológiai paramétert összehasonlítottam a két törpeharcsa (*A.melas*, *A.nebulosus*) esetében az élőhelyek szerint is. Összesen három merisztikus és hét minőségi paramétert vizsgáltam, egyikük sem mutatott szignifikáns különbséget a vízgyűjtő területek között (12 és 13. táblázat). A különböző úszósugárszámok közül a legmagasabb különbséget a farokúszó mutatott, a legalacsonyabb átlagot Gyomaendrődön találtam ($19 \pm 0,89$), míg a hátúszósugárszámok tekintetében az egyedek között elhanyagolható különbség mutatkozott (átlagosan hét sugárszám volt megfigyelhető minden élőhelyen).

Ezen kívül nem volt látható különbség az ivarok között a fenti jellemzők egyikében sem (11. táblázat). Kiegyenlített volt az eloszlás.

Négy élőhelyen (Külső-Béda-tó, Vaja-tó, Szikra-holtág és Jászság-csatorna) megjelent a szürke testszín fehér hassal, mint az *A. nebulosus* vagy hibridek jelenlétére utaló morfológiai határozó bélyeg vagy jelleg. Azonban az általam vizsgált élőhelyek közül csak kettőn (Vaja-tó, Szikra-víztározó) tudtam genetikai vizsgálatok alapján bizonyítani a barna törpeharcsa jelenlétét.

A fajok közötti különbségek jól láthatónak tűnhetnek, de a genetikai vizsgálatok sok kivételre mutattak rá. Az úszósugárszámok, a test színe, a márványozottság, a test pöttyözöttsége és az oldalsó vonal alakja nem mutat egyértelmű különbséget a két faj genetikailag azonosított csoportjai között.

Azonban a két faj közül csak az *A. melas* példányokon tudtam megfigyelni néhány körülírt pöttyöt a test különböző részein (15%, 63 példány, hat élőhely), vagy a szabályos oldalvonalat (6%, 24 példány három élőhelyből), de ezek jelenléte nem volt szoros összefüggésben faj identitásával.

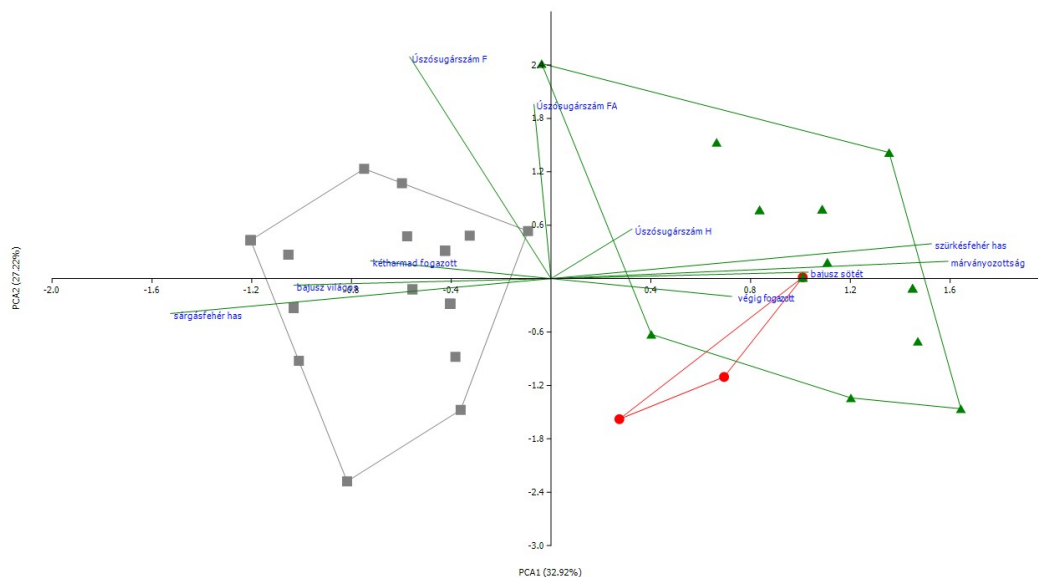
Csak két fenotípusos tulajdonság volt, ami nagyon erős korrelációt mutatott ($-0,91$, $p: 0,00$; $0,86$; $p: 0,00$) a genetikai azonosítás eredményével, a test márványozottsága és test színe (14 ábra).

Egyetlen vajai mintát (3%) kivéve, az összes *Ameiurus nebulosus* genotípusú (37 db) egyed márványozott testszínezettel rendelkezett, akár csak a három hibrid példány Szikra-víztározóból. A 425 elemzett *A. melas* minta közül csak 3 Vajáról származó egyed volt márványozott és egyetlen egyed a Szikra-tározóból. Ez mindössze 1%-a 11 élőhely vizsgált egyedeinek.

A test színezettsége hasonló eredményeket mutatott. Az *A. nebulosus* egyedek teste szürke, márványozott volt fehér hassal. Az *A. melas* genotípus példányainak 98% -a olíva zöld testszínű volt, a hasuk színe pedig sárgás színű volt. A hibrid mintákban mindkét fenotípus jelen volt.

A genetikailag azonosított fajok és a fenotípusos karakterek közötti kapcsolatok ellenőrzésére főkomponens analízist (PCA) is végeztem (az egyetlen élőhely adatait felhasználva, ahol mindkét faj és a hibridek is megtalálhatók voltak) a Szikra-tó törpeharcsáinak adatain.

Az eredmények azt mutatják, hogy a két faj jól megkülönböztethető a testszín és hasszín alapján, illetve a márványozottság szerint. A hibridek fenotípusosan az *A. nebulosus* egyedekhez álltak közelebb. Ezek a változók nagymértékben kapcsolódtak a PC1-hez. Ugyanakkor a mellúszó fogazottsága is erősebb kapcsolatot mutatott a fajokkal (15. ábra).



15. ábra: Főkomponens analízis

Ameiurus melas, *A. nebulosus* és *A. melas* × *A. nebulosus* fenotípusos jellemzői. Az *A. melas* négyszögekkel, az *A. nebulosus* háromszögekkel, a hibridek pontokkal vannak jelölve

A genetikai eredmények alapján azonosított három genotípus egyedei csak a tőserdői élőhelyen származtak azonos környezeti körülmények közül, így itt tudtam vizsgálni azok morfológiai jellemzőit. Ennek alapján a fajok fő morfológiai különbségei a hasi szín és a test márványozottsága volt. A két tulajdonság előfordulása 100% -ban megegyezett a genetikai tesztek eredményével, és megkülönbözteti a két fajt. A hibridekben ezek a tulajdonságok anyai hatást mutatnak (13. táblázat).

13. táblázat: A tóserdői Szikra-holtágból származó három genotípus összegzett fenotípusos adatai. A hibrid egyedek azonosítása genetikai elemzéssel történt.

Genotípus	Bajusz színe		Has színezettség		Márványozottság		Pöttyözöttség		Oldalvonal		Úszósugárszámok		
	sötét	világos	oliva	szürke	látható	nem látható	látható	nem látható	szabályos	nem szabályos	Farokúszó	Farokalatti úszó	Hátúszó
	Egyedszámok										Átlag ± Szórás		
<i>A. melas</i>	15	13	28	0	0	28	0	28	28	0	20±0.6	20±0.8	7±0.2
<i>A. nebulosus</i>	16	2	0	18	18	0	0	18	18	0	20±1	20±0.6	7±0.5
Hibrid	3	0	2	1	3	0	0	3	3	0	19±0.6	20±0.6	7
Morf. hibrid	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	21	20	7



16. ábra: A törpeharcsa fajok morfológiai különbségei. Fenn: *A. melas*; Lenn: *A. nebulosus*, (mindkettő a Szikra-víztározóból). A fajokat leginkább a test színe és a márványozottság különíti el (saját fotó).

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A magyarországi törpeharcsafajok elterjedésének vizsgálata során a legtöbb mintavételi helynél csak *A. melas*-t találtam. Az *A. nebulosus* a vizsgált 11 élőhely közül csak kettőn volt megtalálható. A sárga törpeharcsa jelenlétét, illetve előfordulását nem tudtam igazolni. Ezen túlmenően a mitokondriális genetikai eredmények szerint a hibridizáció mindkét ivari kombinációban megtörténhetett, mivel azonosítottam olyan hibrid egyedeket, amely *A. melas* és olyan hibrid egyedeket is, amely *A. nebulosus* mitokondriális DNS-t hordozott. Ez a jelenség mindössze a hibridizáló fajok egyharmadánál figyelhető meg, a legtöbb faj esetén a természetes hibridizáció csak az egyik kombinációban valósul meg (WIRTZ 1999). Az általam vizsgált állományokban az összes hibrid kifejlett ivarszervvel rendelkezett.

Mindezek az eredmények megerősítik azt a hipotézist, hogy a fekete törpeharcsa (*A. melas*) inváziója folyamatban van, és nemcsak Magyarország természetes vizein, hanem Európában is fokozatosan kiszorítják a barna törpeharcsákat (HARKA 1997, GARCIA-DE-LOMAS et al. 2009, WILHELM 1998, GANTE és SANTOS 2002, LUSK et al. 2010, POPA et al. 2006, NOWAK et al. 2010, KAPUSTA et al. 2010, MOVCHAN et al. 2014, WILHELM et al. 1999) és újabb élőhelyeket hódítanak meg.

A közeli rokon halfajok közötti a természetes hibridizáció gyakori dolog, ami a fajok adaptív terjedésének (inváziójának) és a "szuperfajok" (MORAN és KORNFIELD 1993, MALLET 2005) evolúciójának közös eleme. Eredményeim szerint ennek a jelenségnek az előfordulása figyelhető meg Európában a törpeharcsák között is. A hibrid egyedek felkutatása és azonosítása azonban nehéz, mivel nincsenek egyértelműen értékelhető morfológiai bélyegek.

A fajok és a hibrid egyedek azonosításánál a fenotípusos analízis, mint elsődleges módszer (SPECZIÁR és BERCSÉNYI 2009, RUTKAYOVA et al. 2013) igen nagy valószínűséggel hordoz hibát és bizonytalanságot, mivel az egyes egyedek paramétereinek elkülönült értékelése nehezen valósítható meg objektív módon.

Megbízhatóbb azonosítás lehetséges a genetikai fajazonosítással és az egyed eredetének vizsgálatával. A felállított új multiplex genetikai vizsgálati módszer nagyon megbízhatóan működik az *A. melas* és az *A. nebulosus* fajok azonosításában, mind Észak-Amerikából, mind Európából származó mintákon. Ez a kimutatási eljárás elsősorban az első generációs hibridek azonosítására alkalmas, későbbi generációs hibridek esetében csak korlátozott az információ.

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A fajok genetikai azonosításának eredményeit figyelembe véve értékeltem azon morfológiai paraméterek alkalmazhatóságát, amelyeket leggyakrabban használtak azonosító bélyegként. Ennek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a két faj szétválasztására szélese körben használt fenotípusos bélyegek (sem a fark alatti úszósugárszámok, sem a mellúszósugár fogazottsága) nem alkalmasak a két faj megkülönböztetésére a magyar minták esetében és valószínűleg más európai minták esetében sem (HARKA és PINTÉR 1990, RUTKAYOVA et al. 2013).

A morfológiai és genetikai vizsgálatok eredményének összevetéséből az derült ki, hogy a vizsgált paraméterek közül a test márványozottsága és a szürke/olajzöld testszín, vagy a világos/sárga has mutatta a legerősebb korrelációt a fajok genotípusával. Ezt megerősítette a Szikra-víztározó főkomponens-elemzése is, ahol a két faj és a hibridek együtt található meg a mintavételi területen és a határozó bélyegek megjelenését nem befolyásolhatták a környezeti tényezők.

Feltételezésem szerint az ellentmondásos fenotípus paraméterek a több generációs hibridizáció következtében alakultak ki. Vizsgálataim során a hibrid egyedek aránya kevesebb, mint 1%, ami hasonló az egyéb introgresszív fajoknál megfigyelt hibridizáció mértékéhez (MALLET 2005).

Ez megfelel annak az elméletnek, amely szerint az egy élőhelyen megtalálható fajkomplexekben a morfológiai és genetikai karakterek szétválasztása generációról generációra csökken, a folyamatos hibridizáció, a visszakeresztezés (backcross), a véletlenszerű szegregáció és a kromoszómák között kialakuló rekombináció miatt. Az introgresszió megváltoztatja a résztvevő fajok genetikai hátterét, ami befolyásolja adaptációs és inváziós képességüket, valamint a fajokat elválasztó ökológiai és biológiai határokat. A törpeharcsa fajok esetében pontosan ez a jelenség figyelhető meg Magyarországon is A különböző szülői taxonokból származó különböző genomok keveredése új genetikai kombinációkat generálhat, amelyek új, transzgresszív fenotípusokhoz vezethetnek, s ezeken a természetes kiválasztódás hatása érvényesül (RIESEBERG et al. 1999, FISS et al. 1997, BELL és TRAVIS 2005, MÜLLER et al. 2010). Így a törpeharcsáknál zajló folyamatok nyomon követése fontos, mivel több ökológiai szempontból fontos kérdés megválaszolására is alkalmas modell lehet.

Munkámmal párhuzamosan mások is (HUNNICUTT et al. 2005, WALTER et al. 2014) kifejlesztettek a vizsgált két faj elkülönítésére molekuláris genetikai (PCR-RFLP) markereket, amelyek nagy valószínűséggel szintén alkalmasak a két faj elkülönítésére, azonban ezeket még tesztelni kell nagylétszámú állományokon. A multiplex-PCR-alapú módszer azonban felhasználóbarátabb, gyorsabb, olcsóbb és természetes populációkon is tesztelt módszer, amely rendelkezésre áll.

A multiplex marker készlet kiegészíthető a mások által kifejlesztett, nukleáris Rag2 génre (Rekombináció aktiváló 2-gén -recombination activating gene 2) fejlesztett

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

PCR-RFLP markerrel (HUNNICUTT et al. 2005, WALTER et al. 2014), de a szükséges diszkriminatív markerek száma a törpeharcsa hibridek robosztus azonosítására így sem áll rendelkezésre. A hibrid egyedek keresztezésével létrejövő későbbi generációkból származó hibrid egyedek azonosításának hatékonyságát korlátozza a kromoszómák véletlenszerű szegregációja és a kromoszómák között lezajló rekombináció (mely a kromoszómák közötti átrendeződéshez vezet). Azonban a mitokondriális szekvenálással kiegészített új markerrendszert sikerrel használhatjuk ilyen egyedek azonosítására is.

Következésképpen további vizsgálatokra van szükség a későbbi generációból (F_x) származó hibridek morfológiai és genetikai jellemzőinek vizsgálatához és az introgressziós folyamatok modellezésére is. A kifejlesztett multiplex PCR módszer csak további nukleáris genomi markerekkel együtt lehet alkalmas a későbbi generációs hibridek megbízható azonosítására. A hibrid-azonosítás matematikai modellezéséhez, a későbbi generációkból származó a hibridek besorolásához minimum négy marker szükséges, természetesen ez függ a generációs számtól, de a modell szerint összességében mintegy 70 markert kellene alkalmazni a tiszta fajok és a visszakeresztett hibrid egyedek biztonságos azonosításához (BOECKLEN és HOWARD 1997).

A marker-rendszer kiegészítése további sejtmagi DNS-markerekkel, valamint azok alkalmazhatóságra, érzékenységre és hatékonyságra vonatkozó tesztelése mesterségesen létrehozott F₁, F₂ és talán még későbbi nemzedék (vagy későbbi generációs) hibrid egyedein is ajánlott lenne.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A kutatómunkám során megfogalmazott új tudományos eredmények:

1. Izoláltam és jellemeztem, *A. melas* és az *A. nebulosus* fajok azonosítására alkalmas új nukleáris genomi szekvenciákat, amely segítségével lehetőség nyílik mind az európai, mind a magyarországi törpeharcsa állományok egyedeinek fajazonosítására.
2. Egy új, egyszerű, gyors, olcsó és jól ismételhető multiplex PCR-alapú módszert fejlesztettem ki az *A. melas*, *A. nebulosus* fajok és hibridjeik azonosítására, valamint az *A. natalis* elkülönítésére.
3. Mitokondriális és nukleáris genetikai vizsgálatok alapján elsőként igazoltam, hogy a magyarországi állományokon az eredeti behurcolt fajok azonosítására használt fenotípusos bélyegek közül a test szürke/olajzöld színe és a világos/sárga hasszínezet, illetve a test márványozottsága a legalkalmasabb.
4. Tizenegy magyarországi élőhelyről gyűjtött egyedek mitokondriális és nukleáris genomi vizsgálata során bizonyítottam, hogy az *A. melas* és az *A. nebulosus* fajok természetes hibridizációja lezajlik, igen alacsony, 1% alatti gyakorisággal.
5. Mitokondriális és nukleáris genetikai vizsgálatokkal bizonyítottam, hogy az *A. melas* és az *A. nebulosus* közötti természetes hibridizáció mindkét ivari kombinációban megtörtént és több generáción keresztül introgresszó alakult ki.
6. A reprezentatív mintavételezésből származó elemzéseim elsőként támasztják alá genetikai vizsgálatokkal és statisztikai elemzésekkel azt a megfigyelést, hogy az *A. melas* kiszorítja/kiszorította vizeinkből a korábban gyakoribb barna törpeharcsát.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A barna és fekete (*A. nebulosus* és *A. melas*) törpeharcsa hazánkban igen elterjedt, de nem őshonos lakói vizeinknek. A XIX. század végi behurcolása óta a két faj folyamatosan alkalmazkodik, és verseng az új környezetért, úgy egymással, mint az őshonos fajokkal. Az adaptáció következtében a fajok is változnak, mind morfológiai, mind genetikai szempontból. Kutatómunkám során célom volt a Magyarországra behurcolt törpeharcsa fajok előfordulását, jellemző fenotípusos bélyegeit és hibridizációját morfológiai és molekuláris genetikai módszerekkel vizsgálni. Ennek során több törpeharcsa populáció egyedeit vizsgáltam részben természetes vízi, részben tógazdaságban megtalálható vad állományokból. További célom volt, hogy megvizsgáljam, milyen változások történtek a morfológiai bélyegek fenotípusos jellegében. Feltételezéseim szerint egy evolúciós változásnak vagyunk tanúi, ami már az 1990-es években is tapasztalható volt. Ezt a változást HARKA és PINTÉR (1990) szerzőpáros is leírta. Tanulmányukban jelzik, hogy az eredeti élőhelyhez képest morfológiailag miben térnek el a nálunk megtalálható fajok.

Mindezek miatt az önmagában alkalmazott fenotípusos fajazonosítás sok hibalehetőséget, bizonytalanságot hordoz, néha nehézkes objektíven értékelni az egyes paramétereket, ezért a genetikai vizsgálat az egyetlen biztos módja a fajok azonosításának, és ezzel a módszerrel kutatható a fajok eredete is.

Ezért kutatómunkám további célja volt egy olyan genetikai módszer kidolgozása, mely a fajok és lehetséges hibridjeik gyors és megbízható azonosítását teszi lehetővé. Genetikai vizsgálataim alapjául a halaknál is gyakran használt mitokondriális DNS vizsgálata szolgált. A mitokondriális DNS-re jellemző az anyai öröklődésmentet. Az utódok genotípusát az anya genotípusa határozza meg, és az nem függ a hím egyed genotípusától. Ezért segítségével az anyai származási vonal jól vizsgálható és reprezentatív képet ad a behurcolt fajokról, amellett, hogy a fajok azonosításához is biztos módszert ad. A sejtmagi genom DNS vizsgálata a hibridek azonosítására is megfelelő módszert nyújt. Célom volt, hogy a két módszert együtt alkalmazva vizsgáljam a fajok elterjedését és hibridizációját.

A vizsgálatok során új fajspecifikus fragmenteket írtam le az *A. nebulosus* és *A. melas* fajok azonosítása céljából. A szekvenciák összehasonlító elemzése során kiderült, hogy a két génszakasz azonos lókusztól származik, ám az *A. melas*-ban található változat rövidebb. Hiányzik belőle egy 7bp-os, egy 77bp-os, egy 36bp-os és egy 15bp-os szakasz, valamint további 14 1bp-os szubsztitúció és egy egy bázispáros inszerció is található benne az *A. nebulosus* szekvenciához viszonyítva. A fragmentek egyidejű felsokszorozására egy új multiplex PCR-t dolgoztam ki, amely lehetővé teszi az *A. nebulosus* és *A. melas* fajok és elsőgenerációs hibridjeik azonosítását, illetve az *A. natalis* faj elkülönítését.

Az eredeti élőhelyről behozott genetikailag tiszta minták azonosítási alapként szolgáltak a magyarországi genetikai vizsgálataimhoz. A kidolgozott és biztonsággal, jól működő multiplex PCR-reakcióval minden egyed azonosításra került. Ez a módszer könnyen és jól adaptálható, viszonylag gyors és olcsó.

A későbbi generációból származó hibridek azonosításhoz azonban szükséges a fenotípusosan kérdéses egyedek genomi szekvenálása is.

A 11 élőhelyről származó 466 egyed vizsgálatából kiderült, hogy a fekete törpeharcsa térhódítása nemcsak Európában, de Magyarországon is generációk óta tart. Az élőhelyek nagy többségénél csak a fekete törpeharcsa jelenlétét tudtuk kimutatni. Fontos megjegyezni, hogy a magyarországi vízgyűjtő területeken az általam vizsgált három faj közül (*A.melas*, *A. nebulosus*, *A.natalis*) a sárga törpeharcsát (*A.natalis*) sem morfológiai, sem genetikai vizsgálatokkal nem sikerült azonosítani.

A sejtmagi DNS vizsgálata során két első generációs hibrid egyedet azonosítottam egy olyan élőhelyen, ahol a két faj egymás mellett él. Mindez bizonyítja, hogy az *A. melas* és az *A. nebulosus* fajok természetes hibridizációja lezajlik, bár annak gyakorisága igen alacsony.

Emellett a mitokondriális és nukleáris genetikai vizsgálatok eredményének összevetése két későbbi generációból származó hibrid egyed azonosítását is lehetővé tette, jelezve, hogy több generáción keresztül introgresszó alakult ki, és bizonyítékot szolgáltatott arra is, hogy az *A. melas* és az *A. nebulosus* közötti természetes hibridizáció mindkét ivari kombinációban megtörtént.

A mitokondriális és nukleáris genetikai vizsgálatok alapján beigazolódott, hogy a magyarországi állományokon az eredeti behurcolt fajok azonosítására használt fenotípusos bélyegek közül a has alatti úszó úszósugar száma és a mellúszó fogazottsága nem használható. A korábban leírt bélyegek közül a test színezete (a test márványozottsága, vagy a test szürke/olajzöld színe és a világos/sárga has) a legalkalmasabb a fajok azonosítására.

A megfigyelt introgresszió megváltoztatja a résztvevő fajok genetikai hátterét, ami befolyásolja adaptációs és inváziós képességüket, valamint a fajokat elválasztó ökológiai és biológiai határokat. Ennek a folyamatnak a mélyebb megértése azonban további megfigyelést és nyomkövetést igényel.

10. SUMMARY

In Hungary, brown and black bullhead catfishes (*Ameiurus nebulosus* and *A. melas*) are non-indigenous but widely spread species in natural waters. Since their introduction at the end of the 19th century, these two species have adapted to their new habitat and also competed with each other and indigenous species. Adaptation of species leads to both morphological and genetic changes. The main research objective of the dissertation was to examine the distribution, phenotypic traits and hybridization of bullhead catfishes introduced in Hungary with morphological and molecular genetic methods. Populations of bullhead catfishes used in experiments were sampled from their natural and artificial habitat in Hungarian natural waters and fish farming ponds. The dissertation also examines the changes in traits of species specific phenotypes and assumes that evolutionary changes have happened since the 1990s. HARKA and PINTÉR (1990) have already discussed this evolution and explained the morphological differences between the species present in Hungary and bullhead catfishes in their original habitat in North America.

The use of phenotypic analysis as the primary method of species identification leads to a rather high rate of error and uncertainty, and sometimes it is difficult to evaluate individual parameters objectively. The only reliable method for the determination of species and their origin is genetic identification.

Therefore a new research method based on nuclear genetic markers was developed as a quick and efficient tool to distinguish the bullhead catfish species and their hybrids. Genetic examinations were based on mitochondrial sequence analyses often performed even on fish species. MtDNA is transmitted through maternal inheritance. The genotype of offsprings is determined by the maternal genotype and does not depend on the paternal genotype, which facilitates maternal lineage identification, gives a representative picture of the species introduced in Hungary, and also provides a reliable method for species identification. Nuclear genomic DNA testing is also suitable for the identification of hybrids. The dissertation combined phenotypic analysis with genetic identification to examine species distribution and hybridization. During the experiments, new species-specific fragments were isolated and characterised for the identification of *A. nebulosus* and *A. melas* species. The comparative sequence analysis of the fragments showed that they were amplified from the ortholog of the same locus, but the variant found in *A. melas* was shorter. The latter contained a 7 bp, a 77 bp, a 36 bp, and a 15 bp long deletion, as well as 14 single base pair substitutions and a 1 bp long insertion compared to the *A. nebulosus* sequence. A new multiplex PCR reaction was developed for the amplification of fragments, which facilitates the identification of *A. nebulosus*, *A. melas* and their F1 hybrids, and the discrimination of *A. natalis* species.

“Genetically pure” individual samples from the native habitat in the North America served as reference samples to genetic examinations of Hungarian specimens. All specimens were reliably and efficiently identified with the multiplex PCR reaction developed for this purpose. This method is easy, well adaptable, relatively quick, and cost efficient.

For the identification of post F1 hybrids, genomic sequencing was also necessary in samples from specimens with ambiguous morphology.

The examination of 466 specimens sampled from 11 habitats proved that, for many generations, *A. melas* has been invading natural waters not only all over Europe but also in Hungary. When surveying the distribution of bullhead catfish species in Hungary, only *A. melas* was found at all sampling locations. Out of the three species examined (*A. melas*, *A. nebulosus*, *A. natalis*), neither morphologic or genetic analysis could identify *A. natalis* specimens in Hungarian drainage basins.

During nuclear genomic DNA testing, two F1 hybrids were identified at a sampling location where the two species coexisted, which proves that the natural hybridization of *A. melas* and *A. nebulosus* species occurs but with very low frequency.

In addition, contrasting the results of mitochondrial sequence analyses and nuclear genomic DNA testing made it possible to identify two post F1 hybrids, which shows that significant introgression has occurred over generations and also provides evidence that natural hybridization of *A. melas* and *A. nebulosus* species happened in both direction of sexes.

The mitochondrial sequence analyses and nuclear genomic DNA testing also clarified that two of the distinctive phenotypes most widely used for species identification, the number of rays in the anal fin and the serrations of the pectoral spine, are not suitable to identify the original species in Hungarian populations. Among the phenotypic markers previously described for the identification of *Ameiurus* species, the most reliable morphological parameter is the coloring of the body (the presence of marble mottling, and the grey/oil green body color or the light/yellow belly).

The observed introgression changes the genetic background of the invasive species involved in hybridization, which influences the adaptive spreading and the ecological and biological distribution of species. But further research and monitoring is necessary for a deeper understanding of this process.

11. MELLÉKLETEK

M1. IRODALOMJEGYZÉK

- AKASAKI, T., YANAGIMOTO, T., YAMAKAMI, K., TOMONAGA, H., SATO, S. (2006). Species Identification and PCR-RFLP Analysis of Cytochrome b Gene in Cod Fish (Order Gadiformes) Products. *Journal of Food Science*, 71(3), C190–C195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb15616.x>
- ALVES-SILVA, J., RIBEIRO, J. M. C., VAN DEN ABBEELE, J., ATTARDO, G., HAO, Z., HAINES, L. R., LEHANE, M. J. (2010). An insight into the sialome of *Glossina morsitans morsitans*. *BMC Genomics*, 11, 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-213>
- ANTONESCU, C. S. (1934). Peștii apelor interioare din România.
- ARANISHI, F. (2005a). PCR-RFLP Analysis of Nuclear Nontranscribed Spacer for Mackerel Species Identification (a). *J Agric Food Chem*, 53, 508–511. <https://doi.org/10.1021/JF0484881>
- ARANISHI, F. (2005b). Rapid PCR-RFLP method for discrimination of imported and domestic mackerel (b). *Marine Biotechnology*, 7(6), 571–575. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-4102-1>
- ARANISHI, F. (2006). Single Fish Egg DNA Extraction for PCR Amplification. *Conservation Genetics*, 7(1), 153–156. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-5387-y>
- ARANISHI, F., OKIMOTO, T., OHKUBO, M. (2006). A short-cut DNA extraction from cod caviar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(3), 425–428. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2370>
- ARANISHI, F., OKIMOTO, T., OHKUMBO, M., IZUMI, S. (2006). Molecular Identification of Commercial Spicy Pollack Roe Products by PCR-RFLP Analysis (b). *Journal of Food Science*, 70(4), C235–C238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07165.x>
- ARANISHI F., OKIMOTO T., IZUMI. S. (2005). Identification of gadoid species (*Pisces, Gadidae*) by PCR-RFLP analysis (a). *J. Appl. Genet.*, 46 (1), 65–73. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.466.9035&rep=rep1&type=pdf>
- ARGUE, B. J., DUNHAM, R. A. (1999). Hybrid Fertility, Introgression, and Backcrossing in Fish. *Reviews in Fisheries Science*.

- ARNOLD, M. L., MARTIN, N. H. (2009). Adaptation by introgression. *Journal of Biology*, 8(9), 82. <https://doi.org/10.1186/jbiol1176>
- ASAHIDA, T., KOBAYASHI, T., SAITOH, K., NAKAYAMA, I. (1996). Tissue Preservation and Total DNA Extraction from Fish Stored at Ambient Temperature Using Buffers Containing High Concentration of Urea. *Fisheries Science*, 62(5), 727–730. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/fishsci1994/62/5/62_5_727/_pdf
- ASAHIDA, T., YAMASHITA, Y., KOBAYASHI, T. (1997). Identification of consumed stone flounder, *Kareius bicoloratus* (Basilewsky), from the stomach contents of sand shrimp, *Crangon affinis* (De Haan) using mitochondrial DNA analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 217(2), 153–163. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00039-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00039-7)
- ASENSIO, L., MONTERO, A. (2008). Analysis of fresh fish labelling in Spanish fish retail shops. *Food Control*, 19(8), 795–799. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2007.08.005>
- ASENSIO LUIS, GONZALEZ ISABEL, FERNANDEZ ALICIA, RODRIGUEZ MIGUEL A., HERNANDEZ PABLO E., GARCIA TERESA, A., ROSARIO MARTIN. (2001). PCR-SSCP: A Simple Method for the Authentication of Grouper (*Epinephelus guaza*), Wreck Fish (*Polyprion americanus*), and Nile Perch (*Lates niloticus*) Fillets. *Food Control*, 19, 1720–1723. <https://doi.org/10.1021/JF001185W>
- ASTARLOA JUAN MARTIN DIAZ DE, MABRAGANA EZEQUIEL, HANNER ROBERT, FIGUEROA DANIEL E. (2008). Morphological and molecular evidence for a new species of longnose skate (*Rajiformes: Rajidae: Dipturus*) from Argentinean waters based on DNA. *Zootaxa*, 1921, 35–46.
- BELL, M. A., TRAVIS, M. P. (2005). Hybridization, transgressive segregation, genetic covariation, and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.04.021>
- BLUMER, L. S. (1985). The significance of biparental care in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus*. *Environmental Biology of Fishes*, 12(3), 231–236. <https://doi.org/10.1007/BF00005153>
- BLUMER, L. S. (1986). Parental care sex differences in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* (Pisces, Ictaluridae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 19(2), 97–104. <https://doi.org/10.1007/BF00299944>
- BOECKLEN, W. J., HOWARD, D. J. (1997). Genetic Analysis of Hybrid Zones : Numbers of Markers and Power of Resolution. *Ecology*, 78(8), 2611–2616.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6247908>

- BOTTERO, M. T., CIVERA, T., NUCERA, D., TURI, R. M. (2003). Design of Universal Primers for the Detection of Animal Tissues in Feedstuff. *Veterinary Research Communications*, 27(1), 667–669. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000014243.75976.cd>
- BOTTERO, M. T., DALMASSO, A., CAPPELLETTI, M., SECCHI, C., CIVERA, T. (2007). Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay. *Journal of Biotechnology*, 129(3), 575–580.
- BUCCIARELLI, G., GOLANI, D., BERNARDI, G. (2002). Genetic cryptic species as biological invaders: the case of a Lessepsian fish migrant, the hardyhead silverside *Atherinomorus lacunosus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 273(2), 143–149. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00138-7](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00138-7)
- BYRKJEDAL, I., REES, D. J., WILLASSEN, E. (2007). Lumping lumpsuckers: molecular and morphological insights into the taxonomic status of *Eumicrotremus spinosus* (Fabricius, 1776) and *Eumicrotremus eggvinii* Koefoed, 1956 (*Teleostei: Cyclopteridae*). *Journal of Fish Biology*, 71(sa), 111–131. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01550.x>
- C.I.P. (2003). Cataloguing-in-Publication Data. *Country Study for Biodiversity of the Republic of Macedonia (First National Report)*, 72.
- CALLEJAS, C., OCHANDO, M. D. (1998). Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology*, 53(1), 208–215. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00121.x>
- CALLEJAS, C., OCHANDO, M. D. (2001). Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (*Cyprinidae*) in the Iberian Peninsula. *Journal of Fish Biology*, 59(6), 1589–1599. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00223.x>
- CALO-MATA, P., SOTELO, C. G., PEREZ-MARTIN, R. I., REHBEIN, H., HOLD, G. L., RUSSELL, V. J., SANTOS, A. T. (2003). Identification of gadoid fish species using DNA-based techniques. *European Food Research and Technology*, 217(3), 259–264. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0735-y>
- CARLANDER, K. D. (1977). *Life history data on centrarchid fishes of the United States and Canada*. Iowa State University Press. Retrieved from <https://www.wiley.com/en-hu/Handbook+of+Freshwater+Fishery+Biology,+Volume+Two,+Life+History+Data+on+Centrarchid+Fishes+of+the+United+States+and+Canada-p-9780813806709>
- CARLANDER, K. D. (1969). The handbook of freshwater fishery biology. Iowa State University Press., vol 1, 3 r, 537. Retrieved from <https://www.wiley.com/enu/Handbook+of+Freshwater+Fishery+Biology,+Volume+One,+Life+History+Data+on+Freshwater+Fishes+of+the+United+States+and+Canada,+Exclusive+of+the+Perciformes-p-9780813807096>
- CARRERA, E., GARCIA, T., CESPEDES, A., GONZALEZ, I., FERNANDEZ, A.,

- ASENSIO, L. M., MARTIN, R. (2000). Differentiation of smoked *Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* and *Brama rayi* using the nuclear marker 5S rDNA. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(4), 401–406. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00404.x>
- CARRERA, E., GARCIA, T., CESPEDES, A., GONZALEZ, I., FERNANDEZ, A., HERNANDEZ, P. E., MARTIN, R. (1999a). PCR-RFLP of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: a simple method for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1654–1658. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199909\)79:12<1654::AID-JSFA414>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1654::AID-JSFA414>3.0.CO;2-S)
- CARRERA, E., GARCIA, T., CESPEDES, A., GONZALEZ, I., FERNANDEZ, A., HERNANDEZ, P. E., MARTIN, R. (1999b). Salmon and Trout Analysis by PCR-RFLP for Identity Authentication. *Journal of Food Science*, 64(3), 410–413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb15053.x>
- CASPER, R. M., JARMAN, S. N., DEAGLE, B. E., GALES, N. J., HINDELL, M. A. (2007). Detecting prey from DNA in predator scats: A comparison with morphological analysis, using *Arctocephalus seals* fed a known diet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 347(1–2), 144–154. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2007.04.002>
- CESPEDES, A., GARCIA, T., CARRERA, E., GONZALEZ, I., FERNANDEZ, A., ASENSIO, L., MARTIN, R. (2000). Genetic differentiation between sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(1), 29–32. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000101\)80:1<29::AID-JSFA470>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000101)80:1<29::AID-JSFA470>3.0.CO;2-4)
- CESPEDES, A., GARCIA, T., CARRERA, E., GONZALEZ, I., SANZ, B., HERNANDEZ, P. E., MARTIN, R. (2008). Identification of Flatfish Species Using Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification and Restriction Analysis of the Cytochrome b Gene. *Journal of Food Science*, 63(2), 206–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15710.x>
- CESPEDES ANA, GARCIA TERESA, CARRERA ESTHER, GONZALEZ ISABEL, FERNANDEZ ALICIA, HERNANDEZ PABLO E., A., ROSARIO MARTIN (1999). Identification of Sole (*Solea solea*) and Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR Amplification of the 5S rDNA Gene. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1046–1050. <https://doi.org/10.1021/JF9810970>
- CHAKRABORTY, A., ARANISHI, F., IWATSUKI, Y. (2005). Molecular identification of hairtail species (*Pisces: Trichiuridae*) based on PCR-RFLP analysis of the mitochondrial 16S rRNA gene. *J Appl Genet*, 46, 381–385. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/7488748>
- CHAKRABORTY, A., ARANISHI, F., IWATSUKI, Y. (2007). Polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis for species

- identification of hairtail fish fillets from supermarkets in Japan. *Fisheries Science*, 73(1), 197–201. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01319.x>
- CRAWSHAW, L. I. (1984). Low-temperature dormancy in fish. *The American Journal of Physiology*, 246(4 Pt 2), R479–86. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.246.4.R479>
- CROSS, T. F. (2000). Genetic implications of translocation and stocking of fish species, with particular reference to Western Australia. *Aquaculture Research*, 31(1), 83–94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00439.x>
- CUCHEROUSSET J., PAILLISSON J.-M., CARPENTIER A., EYBERT M.-C., OLDEN J. D. (2006). Habitat use of an artificial wetland by the invasive catfish *Ameiurus melas*. *Ecology of Freshwater Fish*, 15, 589–596. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2006.00199.x>
- CVIJANOVIC, G., LENHARDT, M., HEGEDIS, A. (2005). The first record of black bullhead *Ameiurus melas* (Pisces, Ictaluridae) in Serbian waters. *Archives of Biological Sciences*, 57(4), 307–308. <https://doi.org/10.2298/ABS0504307C>
- DHORA D. (2010). Regjister i specieve te faunes se shqiperise (Register of Species of the Fauna of Albania). *Shkode`r: Camaj-Pipa*, 155.
- DOADRIO I. (2001). Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España. *Direccio`n General de Conservacio`n de La Naturaleza, Madrid*, 364.
- ELVIRA, B. (1984). First records of the North American catfish *Ictalurus melas* (Rafinesque, 1820)(Pisces, Ictaluridae) in Spanish waters. *Cybium 3E Ser*, 8(1), 96–98. Retrieved from <http://www.ucm.es/info/zoo/Vertebrados/elvira/Elvira1984.pdf>
- ELVIRA, B. (2000). Identification of non-native freshwater fishes established in Europe and assessment of their potential threats to the biological diversity. *Convention of the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Standing Committee 21st Meeting, Strasbourg*.
- ERCOLINI, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297 – 314. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.006>
- ESPINEIRA, M., GONZALEZ-LAVIIN, N., VIEITES, J. M., SANTA CLARA, F. J. (2008). Development of a Method for the Genetic Identification of Flatfish Species on the Basis of Mitochondrial DNA Sequences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8954–8961. <https://doi.org/10.1021/jf800570r>
- EVANS, S. (1983). Uses and abuses of analysis of variance. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 15(6), 629–648. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1983.tb01544.x>
- FAO (1997). FAO database on introduced aquatic species.

- FAO. (2010). FAO database of introduced aquatic species—*Ameiurus melas*, *Ameiurus nebulosus* FAO. Retrieved from <http://www.fao.org/fishery/introsp/search/en>
- FERGUSON, M. M. (1990). The genetic impact of introduced fishes on native species. *Canadian Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1139/z90-153>
- FISS, F. C., SAMMONS, S. M., BETTOLI, P. W., BILLINGTON, N. (1997). Reproduction among saugeyes (F sub(x) hybrids) and walleyes in Normandy Reservoir, Tennessee. *North American Journal of Fisheries Management [N.A.M.J.FISH.MANAGE.]*, 17(1), 215–219. [https://doi.org/10.1577/1548-8675\(1997\)017<0215](https://doi.org/10.1577/1548-8675(1997)017<0215)
- FITZPATRICK, B. M., JOHNSON, J. R., KUMP, D. K., SHAFFER, H. B., SMITH, J. J., VOSS, S. R. (2009). Rapid fixation of non-native alleles revealed by genome-wide SNP analysis of hybrid tiger salamanders. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 176. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-176>
- FOLMER, O, BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R., VRIJENHOEK, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299. Retrieved from https://www.mbari.org/wp-content/uploads/2016/01/Folmer_94MMBB.pdf
- FRANK S. (1956). Sumecek americky (*Ameiurus nebulosus* Le Sueur 1819) vnasich vodach. *Čas. Nar. Musea*, 125 (1), 35–47.
- GANTE, H. F., SANTOS, C. D. (2002). First records of the North American catfish *Ameiurus melas* in Portugal. *Journal of Fish Biology*, 61(6), 1643–1646. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb02504.x>
- GARCIA-DE-LOMAS, J., DANA, E. D., LOPEZ-SANTIAGO, J., GONZALEZ, R., CEBALLOS, G., ORTEGA, F. (2009). First record of the North American black bullhead *Ameiurus melas* (Rafinesque, 1820) in the Guadalquivir Estuary (Southern Spain). *Aquatic Invasions*, 4(4), 719–723. <https://doi.org/10.3391/ai.2009.4.4.23>
- GEITER, O., HOMMA, S., KINZELBACH, R., BIOLOGIE, U. VON. (2002). Bestandsaufnahme und Bewertung von Neozoen in Deutschland. *Jagdverband.de Umweltbundesamt*, 308. Retrieved from http://www.jagdverband.de/sites/default/files/2002_forschungsbericht_des_bmu_bestandsaufnahme_und_bewertung_von_neozoen_in_deutschland_0.pdf
- GLOVER, R. H., COLLINS, D. W., WALSH, K., BOONHAM, N. (2010). Assessment of loci for DNA barcoding in the genus *Thrips* (*Thysanoptera:Thripidae*). *Molecular Ecology Resources*, 10(1), 51–59. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02723.x>
- GRANADEIRO, J., SILVA MA. (2000). The use of otoliths and vertebrae in the identification and size-estimation of fish in predator-prey studies. *Cybiuim*, 24, 383–393. Retrieved from

https://www.researchgate.net/profile/Monica_Silva7/publication/234555556_The_use_of_otoliths_and_vertebrae_in_the_identification_and_size-estimation_of_fish_in_predator-prey_studies/links/00b4952d6670658e6d000000/The-use-of-otoliths-and-vertebrae-in-the-i

- GYÖRE K., SALLAI Z. (1998). A Körös-vízrendszer halfaunisztikai vizsgálata. *Crisicum I.*, 211–228. Retrieved from http://kmnp.nemzetipark.gov.hu/_user/browser/File/CRISICUM_I_pdf/I_211_228_Gyore_etal.pdf
- HARDMAN, M., PAGE, L. M. (2003). Phylogenetic Relationships among Bullhead Catfishes of the Genus *Ameiurus* (Siluriformes: *Ictaluridae*). *Copeia*, 2003(1), 20–33. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2003\)003\[0020:PRABCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2003)003[0020:PRABCO]2.0.CO;2)
- HARKA, ÁKOS, PINTÉR KÁROLY (1990). Systematic status of hungarian bullhead pout: *Ictalurus nebulosus pannonicus* ssp.n. *Tiscia (Szeged)*, 25., 65–73.
- HARKA ÁKOS (1997). Terjed a vizeinkben a fekete törpeharcsa. *Halászat*, 90., 109–110.
- HARTVICH P., LUSK. S. (2006). The first record of the black bullhead (*Ameiurus melas*) in the Tøeboð district, Czech Republic. *Biodiverzita Ichtyofauny ÈR*, VI., 55–58.
- HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L., DEWAARD, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society*, 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- HEBERT, P. D. N., RATNASINGHAM, S., DEWAARD, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *The Royal Society*, 270, S96–S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- HENEGARIU, O., HENEGARIU, O., HEEREMA, N., HEEREMA, N., DLOUHY, S., DLOUHY, S., VOGT, P. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. *Bio Techniques*, 23(September), 504–511.
- HOLCIK, J. (2006). Is the naturalization of the paddlefish in the Danube River basin possible? *Journal of Applied Ichthyology*, 22(1), 40–43. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.00927.x>
- HOLMES, B. H., STEINKE, D., WARD, R. D. (2009). Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research*, 95, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2008.09.036>
- HOROSZEWICZ L. (1971). The European catfish. *PWRiL, Warszawa (in Polish)*.
- HUBALKOVA, Z., KRÁLIK, P., TREMLLOVA, B., RENCOVA, E. (2007). Methods of gadoid fish species identification in food and their economic impact

- in the Czech Republic: a review. *Veterinarni Medicina*, 52(7), 273–292. Retrieved from <https://81.0.228.28/publicFiles/00279.pdf>
- HUNNICUTT DAVID H., CINGOLANI JOHN, VOSS MARGARET A. (2005). Use of mtDNA to identify genetic introgression among related species of catfish. *J. Great Lakes Res., Internat. Assoc. Great Lakes Res.*, 31(4), 482–491. Retrieved from https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/43934448/Use_of_mtDNA_to_Identify_Genetic_Introgr20160320-26772_kwrxf4.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1530127549&Signature=wDOWc4d9EGRYmRtxJciBgRezqC4%253D&response-content-disposition=inlin
- HUZSVAI, L., VINCZE, S. (2012). *SPSS-könyv*. Seneca Books.
- IBANEZ, A. L., COWX, I. G., O'HIGGINS, P. (2007). Geometric morphometric analysis of fish scales for identifying genera, species, and local populations within the Mugilidae. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 64, 1091–1100. <https://doi.org/10.1139/F07-075>
- IRWIN N., KAAREN J. A. (2001). In Vitro Amplification of DNA by the Polymerase. *Molecular Cloning*.
- IVANOVA, N. V., ZEMLAK, T. S., HANNER, R. H., HEBERT, P. D. N. (2007). Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 544–548. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x>
- JONDEUNG, A., SANGTHONG, P., ZARDOYA, R. (2007). The complete mitochondrial DNA sequence of the Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*), and the phylogenetic relationships among Siluriformes. *Gene*, 387(1–2), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.08.001>
- JORGENSEN, H. B. H., PERTOLDI, C., HANSEN, M. M., RUZZANTE, D. E., LOESCHCKE, V. (2008). Genetic and environmental correlates of morphological variation in a marine fish: the case of Baltic Sea herring (*Clupea harengus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 65, 389–400. <https://doi.org/10.1139/F07-177>
- JOSE MADEIRA, M., GOMEZ-MOLINER, B. J., BARBE, A. M. (2005). Genetic introgression on freshwater fish populations caused by restocking programmes. *Issues in Bioinvasion Science: EEI 2003: A Contribution to the Knowledge on Invasive Alien Species*, 117–125. https://doi.org/10.1007/1-4020-3870-4_11
- KAPUSTA, A., MORZUCH, J., PARTYKA, K., BOGACKA-KAPUSTA, E. (2010). First record of brown bullhead, *Ameiurus nebulosus* (LeSueur), in the Łyna River drainage basin (northeast Poland). *Archives of Polish Fisheries*, 18(4). <https://doi.org/10.2478/v10086-010-0030-z>
- KOCHZIUS M. (2009). Trends in fishery genetics. In: Beamish RJ, Rothschild BJ, eds. The future of fisheries science in North America. *Fish & Fisheries Series*, 31, 453–493. Retrieved from

https://books.google.hu/books?hl=hu&lr=&id=reaf-UR0n_8C&oi=fnd&pg=PR1&dq=Trends+in+fishery+genetics.+In:+Beamish+RJ,+Rothschild+BJ,+eds.+The+future+of+fisheries+science+in+North+America&ots=j3RYlv6sc8&sig=0tDTycKVat3PBIKmlLW7lmlk6ko&redir_esc=y#v=onepage&

- KOCHZIUS, M., NOLTE, M., WEBER, H., SILKENBEUMER, N., HJÖRLEIFSDOTTIR, S., HREGGVIDSSON, G. O., BLOHM, D. (2008). DNA Microarrays for Identifying Fishes. *Marine Biotechnology*, 10(2), 207–217. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9068-3>
- KOCHZIUS, M., SEIDEL, C., ANTONIOU, A., BOTLA, S. K., CAMPO, D., CARIANI, A., BLOHM, D. (2010). Identifying fishes through DNA barcodes and microarrays. *PLoS ONE*, 5(9), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012620>
- KOSCO, J., KOSUTH, P., HARKA, Á., WILHELM, A. (2000). Další nový druh v našej ichtyofaune – sumček čierny (Another new species in our ichthyofauna-black catfish). *Poľovníctvo a Rybárstvo (Hunting And Fishing)*, 52 (1), 33.
- KOSCO J., KOSUTH P., LUSK S., KOSUTHOVA L. (2004). Distribution of family Ictaluridae in the Slovakia and in the Czech Republic. *Biodiverzita Ichtyofauny ČR, V.*, 45–53.
- KVASNICKA, F. (2005). Capillary electrophoresis in food authenticity. *Journal of Separation Science*, 28(9–10), 813–825. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500054>
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., HIGGINS, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- LE NGUYEN, D. D., NGOC, H. H., DIJOUX, D., LOISEAU, G., MONTET, D. (2008). Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on Pangasius fish from Viet Nam. *Food Control*, 19(5), 454–460. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2007.05.006>
- LEUNDA, P. M., OSCOZ, J., ELVIRA, B., AGORRETA, A., PEREAK, S., MIRANDA, R. (2008). Feeding habits of the exotic black bullhead *Ameiurus melas* (Rafinesque) in the Iberian Peninsula: first evidence of direct predation on native fish species. *Journal of Fish Biology*, 73, 96–114. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01908.x>
- LHOTSKY O. (1995). Peť století rybnicňho hospodařství v Trěboni. *Carpio. Trěboně*, 212.
- LINDSEY, C. C. (1963). Sympatric Occurrence of Two Species of Humpback Whitefish in Squanga Lake, Yukon Territory. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 20(3), 749–767. <https://doi.org/10.1139/f63-050>

- LOCKLEY, A. ., BARDSLEY, R. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), 67–77. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00049-2)
- LORENZONI, M., MEARELLI, M., GHETTI, L. (2006). Native And Exotic Fish Species In The Tiber River Watershed (Umbria – Italy) And Their Relationship To The Longitudinal Gradient. *Bull. Fr. Pêche Piscic*, 382, 19–44. <https://doi.org/10.1051/kmae:2006005>
- LU G., BASLEY D.J., B. L. (2001). Contrasting patterns of mitochondrial DNA and microsatellite introgressive hybridization between lineages of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*); relevance for speciation. *Molecular Ecology*, 10, 965–985. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.715.7485&rep=rep1&type=pdf>
- LUSK, S., LUSKOVA, V., HANEL, L. (2010). Alien fish species in the Czech Republic and their impact on the native fish fauna. *Folia Zool.*, 59(1), 57–72. Retrieved from http://www.ivb.cz/folia_zoologica/archive/59_57-72.pdf
- MALDINI, M., NONNIS MARZANO, F., FORTES, G. G., PAPA, R., GANDOLFI, G. (2006). Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture*, 261(2), 487–494. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2006.07.010>
- MALLET, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.010>
- MICHELINI, E., CEVENINI, L., MEZZANOTTE, L., SIMONI, P., BARALDINI, M., DE LAUDE, L., RODA, A. (2007). One-Step Triplex-Polymerase Chain Reaction Assay for the Authentication of Yellowfin (*Thunnus albacares*), Bigeye (*Thunnus obesus*), and Skipjack (*Katsuwonus pelamis*) Tuna DNA from Fresh, Frozen, and Canned Tuna Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7638–7647. <https://doi.org/10.1021/jf070902k>
- MILLER, S. A., DYKES, D. D., POLESKY, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- MOLNÁR J. (1954). Kinek köszönhetjük a törpeharcsa betelepítését. *Halászat*, 9(1. évfolyam), 15.
- MORAN, P., KORNFIELD, I. (1993). Retention of an Ancestral Polymorphism in the Mbuna Species Flock (Teleostei: Cichlidae) of Lake Malawi. *Molecular Biology and Evolution*, 10 (5), 1015–1029. Retrieved from https://www.nwfsc.noaa.gov/assets/2/6764_08032011_101306_Moran.and.Kornfield.1993-rev.pdf
- MOURA, T., SILVA, M. C., FIGUEIREDO, I., NEVES, A., MUNOZ, P. D., COELHO, M. M., GORDO, L. S. (2008). Molecular barcoding of north-east Atlantic deep-water sharks: species identification and application to fisheries

- management and conservation. *Marine and Freshwater Research*, 59(3), 214–223. <https://doi.org/10.1071/MF07192>
- MOVCHAN, Y. V, TALABISHKA, E. M., VELIKOPOLSKIY, I. J. (2014). Fishes Of The Genus *Ameiurus* (Ictaluridae, Siluriformes) In The Transcarpathian Water Bodies. *Vestnik Zoologii*, 48 (2), 149–156. <https://doi.org/10.2478/vzoo-2014-0015>
- MÜLLER, T., HORVÁTH, Á., TAKAHASHI, E., KOLICS, B., BAKOS, K., DECSI, K., KOVÁCS, B., TALLER, J., URBÁNYI, B., BERCSÉNYI, M., HORVÁTH, L., ADACHI, S., ARAI K., YAMAHA, E. (2012). Artificial hybridization of Japanese and European eel (*Anguilla japonica* × *A. anguilla*) by using cryopreserved sperm from freshwater reared males. *AQUACULTURE*.
- MÜLLER T., TALLER J., KOLICS B., KOVÁCS B., URBÁNYI B. (2010). First record of natural hybridization between pikeperch (*Sander lucioperca*) and Volga pikeperch (*S. volgensis*). *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 481–484.
- NOVOMESKA, A., KOVAC, V. (2009). Life-history traits of non-native black bullhead (*Ameiurus melas*) with comments on its invasive potential. *Journal of Applied Ichthyology*, 25(1), 79–84. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01166.x>
- NOWAK M., SZCZERBIK P., TATOJ K., POPEK. W. (2011). AACL BIOFLUX Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society Non-native freshwater fishes in Poland: an overview. *Department of Ichthyobiology and Fisheries, Univeristy of Agriculture in Kraków*, 9, 30–199.
- NOWAK, M., KOSCO, J., SZCZERBIK, P., MIERZWA, D., POPEK, W. (2010). When did the black bullhead, *Ameiurus melas* (Teleostei: Ictaluridae), arrive in Poland? *Arch. Pol. Fish*, 18, 183–186. <https://doi.org/10.2478/v10086-010-0021-0>
- NOWAK, M., SZCZERBIK P., TATOJ K., POPEK W. (2008). Non-native freshwater fishes in Poland: an overview. *International Journal of the Bioflux Society*, 173–191. Retrieved from <http://dlc.dlib.indiana.edu/dlc/handle/10535/6922>
- OVERDYK, L. M., BRAID, H. E., NAAUM, A. M., CRAWFORD, S. S., HANNER, R. H. (2016). Real-time PCR identification of lake whitefish *Coregonus clupeaformis* in the Laurentian Great Lakes. *Journal of Fish Biology*, 88, 1460–1474. <https://doi.org/10.1111/jfb.12922>
- PAGE, L. M., BURR, B. M. (1991). National Audubon Society., National Wildlife Federation., & Roger Tory Peterson Institute.. *A field guide to freshwater fishes : North America north of Mexico*. Houghton Mifflin. Retrieved from <https://catalog.hathitrust.org/Record/002498916>
- PALUMBI, S. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular Systematics*, 205–247.

- PAYSEUR, B. A., KRENZ, J. G., NACHMAN, M. W. (2004). Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 58(9), 2064–2078. <https://doi.org/10.1554/03-738>
- PEDICILLO G., BICCHI A., ANGELI V., CAROSI A., VIALI P., LORENZONI M. (2008). Growth of black bullhead *Ameiurus melas* (Rafinesque, 1820) in Corbara Reservoir (Umbria – Italy). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 389(111221), 5. <https://doi.org/10.1051/kmae/2008011>
- PIERCE, G., BOYLE P.R. (1991). A review of methods for diet analysis in piscivorous marine mammals. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev (Lond)*, 29, 409–486. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Graham_Pierce2/publication/237043776_A_review_of_methods_of_diet_analysis_in_piscivorous_marine_mammals/links/5810912408aea04bbcbd0477/A-review-of-methods-of-diet-analysis-in-piscivorous-marine-mammals.pdf
- PINTÉR K. (1976). A Törpeharcsa (*Ictalurus nebulosus*, Le Sueur). *Halászat*, 69.évf.mel, 113.
- PINTÉR K. (1991). A fekete törpeharcsa (*Ictalurus melas*, Rafinesque, 1820) megjelenése a Tisza vízrendszerében. *Halászat*, 84. évf.,2, 94–96.
- PINTÉR K. (2002). *Magyarország halai*. Kiadó, Akadémiai, második áttoldozott kiadás.
- POPA LUIS OVIDIU , POPA OANA PAULA, P. E. I., IFTIME ALEXANDRU, M. S., DIACONU FLORINA, M. D. (2006). The First Record Of *Perccottus Glenii* Dybowski, 1877 (Pisces: Odontobutidae) And *Ameiurus melas* Rafinesque, 1820 (Pisces: Ictaluridae) From The Romanian Sector Of The Danube. *Travaux Du Muséum National d'Histoire Naturelle «Grigore Antipa»*, XLIX (49.), 323–329.
- POTEAUX, C., BERREBI, P., BONHOMME, F. (2000). Allozymes, mtDNA and microsatellites study introgression in a stocked trout population in France. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10(3), 281–292. <https://doi.org/10.1023/A:1016687714621>
- PROBER J.M., TRAINOR G.L., DAM R.J., HOBBS F.W., ROBERTSON C.W., ZAGURSKY R.J., COCUZZA A.J., JENSEN M.A., BAUMEISTER K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, 238, 336–341. Retrieved from http://n.ethz.ch/~nbennett/download/Reading_NEW/Recombinant_DNA/Prober.pdf
- JENKINS, R. E., BURKHEAD, N. M. (1994). *Freshwater Fishes of Virginia*. American Fisheries Society. Retrieved from <https://ptztinpoy.updog.co/cHR6dGlucG95MDkxMzIzNTg3Mw.pdf>
- RAKAJ, N., FLLOKO, A. (1995). Conservation status of freshwater fish of Albania.

11. MELLÉKLETEK - IRODALOMJEGYZÉK

- Biological Conservation*, 72(2), 195–199. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(94\)00082-2](https://doi.org/10.1016/0006-3207(94)00082-2)
- RECOVER ALL™ Total Nucleic Acid Isolation Kit Protocol (2011): Life Technologies Corporation. All rights reserved. Part Number 1975M Rev. C 02/2011 (.pdf).
- REHBEIN H. (1990): Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Z Lebensm Unters Forsch* 191:1–10.
- RHYMER, J. M., SIMBERLOFF, D. (1996). Extinction By Hybridization And Introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.27.1.83>
- RIBEIRO, F., COLLARES-PEREIRA, M. J., MOYLE, P. B. (2009). Non-native fish in the fresh waters of Portugal, Azores and Madeira Islands: a growing threat to aquatic biodiversity. *Fisheries Management and Ecology*, 16(4), 255–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2009.00659.x>
- RIBEIRO, J. M. C., GENTA, F. A., SORGINE, M. H. F., LOGULLO, R., MESQUITA, R. D., PAIVA-SILVA, G. O., OLIVEIRA, P. L. (2014). An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), 27. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002594>
- RIESEBERG, L. H. (1997). Hybrid Origins Of Plant Species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 28, 359–89. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/1daf/ae0eaa3cd62772689eefa392ea855cad1985.pdf>
- RIESEBERG, L. H., ARCHER, M. A., WAYNE, R. K. (1999). Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*, 83, 363–372. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.581.9200&rep=rep1&type=pdf>
- ROHLF, F. (1990). Rotational fit (Procrustes) Methods in: Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. *The University of Michigan Museum of Zoology*, Chapter 10, 227–236. Retrieved from <https://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/49535>
- RUTKAYOVA, J., BISKUP, R., HARANT, R., SLECHTA, V., KOSCO, J. (2013). *Ameiurus melas* (black bullhead): Morphological characteristics of new introduced species and its comparison with *Ameiurus nebulosus* (brown bullhead). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23(1), 51–68. <https://doi.org/10.1007/s11160-012-9274-6>
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230(4732), 1350–1354.

<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2999980>

- SALLAI Z. (2001). Adatok a hevesi füves puszták tájvédelmi körzet halfaunájához, különös tekintettel a Hanyi-érre. *Nimfea Természetvédelmi Egyesület Kiadványa*, 49–58.
- SANZ, N., ARAGUAS, R. M., FERNANDEZ, R., VERA, M., GARCIA-MARIN, J.-L. (2009). Efficiency of markers and methods for detecting hybrids and introgression in stocked populations. *Conservation Genetics*, 10(1), 225–236. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9550-0>
- SCOTTI-SAINTAGNE, C., MARIETTE, S., PORTH, I., GOICOECHEA, P. G., BARRENECHE, T., BODÉNÈS, C., KREMER, A. (2004). Genome scanning for interspecific differentiation between two closely related oak species [*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.]. *Genetics*, 168(3), 1615–26. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.026849>
- SIMON T. P., WALLUS R. (2004). Reproductive Biology and Early Life History of Fishes in the Ohio River Drainage. (C. PRESS, Ed.). USA, Florida 33431, Corporate Blvd., Boca Raton: CRC PRESS.
- SMITH P. J., MCVEAGH, S. M., STEINKE, D. (2008). DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology*, 72, 464–471. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01745.x>
- SMITH L.L. (1949). Cooperative fishery survey of upper Mississippi River. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 76, 279–282.
- SOTELO, C. G., CALO-MATA, P., CHAPELA, J., PÉREZ-MARTIN, R. I., REHBEIN, H., HOLD, G. L., SANTOS, A. T. (2001). Identification of Flatfish (Pleuronectiforme) Species Using DNA-Based Techniques. *J. Agric. Food Chem*, 49, 4562–4569. <https://doi.org/10.1021/jf010452a>
- SPECZIÁR A., BERCSÉNYI M., MÜLLER T. (2009). Morphological characteristics of hybrid pikeperch. *Acta Zool Acad Sci*, 55 (1)(1), 39–54.
- SPILLMANN C.J. (1961). Fauna de France. *Poissons d'eau Douce*, 65, 168–169.
- STEINKE, D., ZEMLAK, T. S., HEBERT, P. D. N. (2009). Barcoding Nemo: DNA-Based Identifications for the Ornamental Fish Trade. *PLoS ONE*, 4(7), e6300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006300>
- STRAUSS, R. E., BOND, C. E. (1990). Taxonomic Methods: Morphology In: Schreck CB, Moyle PB (eds) Methods for fish biology. *American Fisheries Society*, 109–140. Retrieved from <http://www.faculty.biol.ttu.edu/strauss/Pubs/Papers/1990StraussBond.pdf>
- STUBER, R. J. (1982). Habitat Suitability Index Models: Black Bullhead. *U. S. Dept. I Nt . Fish Wi Idl. Ser v . FWS/OBS- 82/ a.14 .*, 25. Retrieved from <https://archive.usgs.gov/archive/sites/www.nwrc.usgs.gov/wdb/pub/hsi/hsi-014.pdf>

- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- TELETSCHEA, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev Fish Biol Fisheries*, 9, 265–293. <https://doi.org/10.1007/s11160-009-9107-4>
- TELETSCHEA, F., BERNILLON, J., DUFFRAISSE, M., LAUDET, V., HANNI, C. (2008). Molecular identification of vertebrate species by oligonucleotide microarray in food and forensic samples. *Journal of Applied Ecology*, 45(3), 967–975. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01415.x>
- TORTONESE E. (1970). Osteichthyes (Pesci Ossei) I, Fauna Ittica (Osteichthyes(bony fish) I. *Fish Fauna*, 10, 565.
- TROTTA M., SCHÖNHUTH S., PEPE T., CORTESI M. L., PUYET A., BAUTISTA J. M. (2005). Multiplex PCR Method for Use in Real-Time PCR for Identification of Fish Fillets from Grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* Species) and Common Substitute Species. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2039–2045. <https://doi.org/10.1021/JF048542D>
- UZUNOVA E., ZLATANOV S. (2007). A review of the fish introductions in Bulgarian freshwaters. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 37 (1), 55–61. Retrieved from https://www.aiep.pl/volumes/2000/7_1/pdf/08_803_FULLTEXT_Uzunova_and_Zlatanov.pdf
- VINGINDER CS. (2003). A törpeharcsa (*Ictalurus nebulosus*) hasznosításának új lehetőségei. *Agrártudományi Közlemények*, 10. Különs, 1–3.
- VINDINGER CS. (2005). A törpeharcsa ivadéknevelésének eredményei recirkulációs haltermelő rendszerekben. *Agrártudományi Közlemények*, 16. Különs, 46–50. Retrieved from <http://www.date.hu/acta-agraria/2005-16/vinginder.pdf>
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T. VAN DE, HORNES, M., ZABEAU, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- VOSTRADOVSKY J. (1958). On biology and economically impotence of *Ameiurus nebulosus* Le Sueur, 1819 in our waters. *Živočišná Výroba*, 31, 321–332.
- WALTER R. P., GNYRA E. S, SÖDERBERG L. I., HEATH. D. D. (2014). Rapid genetic identification of brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*), black bullhead (*Ameiurus melas*) and their hybrids. *Conservation Genetics Resources*, 6 (3), 507–509.

- WARD, R. D., HANNER, R., HEBERT, P. D. N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74, 329–356. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02080.x>
- WARD, R. D., HOLMES, B. H., WHITE, W. T., LAST, P. R. (2008). DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research*, 59, 57–71. <https://doi.org/10.1071/MF07148>
- WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R., HEBERT, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1847–1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- WATANABE, S., MINEGISHI, Y., YOSHINAGA, T., AOYAMA, J., TSUKAMOTO, K. (2004). A Quick Method for Species Identification of Japanese Eel (*Anguilla japonica*) Using Real-Time PCR: An Onboard Application for Use During Sampling Surveys. *Marine Biotechnology*, 6(6), 566–574. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-1000-5>
- WEDER, J. K., REHBEIN, H., KAISER, K.-P. (2001). On the specificity of tuna-directed primers in PCR-SSCP analysis of fish and meat. *European Food Research and Technology*, 213(2), 139–144. <https://doi.org/10.1007/s002170100339>
- WELCOMME, R. L. (1988). *International introductions of inland aquatic species*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/X5628E/X5628E00.htm>
- WELSH, S. A., CINCOTTA, D. A. (2004). Natural Hybrids of the Madtoms, *Noturus flavus* and *Noturus insignis*, from the Monongahela River Drainage, West Virginia. *NORTHEASTERN NATURALIST*, 11(4), 399–406. Retrieved from http://www.wvuforestry.com/sWelsh/Welsh_and_Cincotta_2004.pdf
- WESSA, P. (2015). Free Statistics Software, Office for Research Development and Education.
- WHEELER A. (1978). *Ictalurus melas* (Rafinescu, 1820) and *Ictalurus nebulosus* (Le Sueur, 1819): the North American catfish in Europe. *J. Fish. Biol.*, 12, 435–439.
- WHEELER, A., MAITLAND, P. S. (1973). The scarcer freshwater fishes of the British Isles. I. Introduced species. *Journal of Fish Biology*, 5(1), 49–68. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04430.x>
- WILHELM S., GYÖRE K., SALLAI Z. (1999). A Hármás-Körös fekete törpeharcsa (*Ictalurus melas* Raf. 1820) populációjának biometriai vizsgálata, 37–40.
- WILHELM S. (1998). A fekete törpeharcsa (*Ictalurus melas* Rafinesque 1820) térhódítása az Ér folyó völgyében.
- WILHELM S. (1999). A Berettyó és Ér folyók fekete törpeharcsa (*Ictalurus melas*,

- Rafinesque, 1820) állományának biometriai vizsgálata, 131–134.
- WILHELM S. (2013). A törpeharcsa *Monográfia. Erdélyi Múzeum-Egyesület Kolzsvár.*
- WIRTZ, P. (1999). Mother species-father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. *Animal Behaviour*, 58(1), 1–12. <https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1144>
- WITKOWSKI A. (2002). Introduction of fishes into Poland: benefaction or plague? *Nature Conservation*, 59, 41–52. Retrieved from <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-article-1486e2f3-d407-4820-a69d-d821c09d142c?q=bwmeta1.element.agro-volume-ce39ae75-d70b-44f3-8764-bcb25e111d5c;4&qt=CHILDREN-STATELESS>
- WOLF, C., BURGENER, M., HÜBNER, P., LÜTHY, J. (2000). PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species. *LWT - Food Science and Technology*, 33(2), 144–150. <https://doi.org/10.1006/FSTL.2000.0630>
- WOLF, C., HÜBNER, P., LÜTHY, J. (1999). Differentiation of sturgeon species by PCR-RFLP. *Food Research International*, 32(10), 699–705. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00150-7)
- WONG, E. H. K., HANNER, R. H. (2008). DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Research International*, 41, 828–837. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.07.005>
- WUERTZ, S., BELAY, M., KIRSCHBAUM, F. (2007). On the risk of criminal manipulation in caviar trade by intended contamination of caviar with PCR products. *Aquaculture*, 269(1–4), 130–134. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2007.05.027>
- XIAO, W., ZHANG, Y., LIU, H. (2001). Molecular systematics of *Xenocyprinae* (Teleostei: *Cyprinidae*): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2), 163–173. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0879>
- YANCY, H. F., ZEMLAK, T. S., MASON, J. A., WASHINGTON, J. D., TENGE, B. J., NGUYEN, N.-L. T., HEBERT, P. D. N. (2008). Potential Use of DNA Barcodes in Regulatory Science: Applications of the Regulatory Fish Encyclopedia. *Journal of Food Protection*, 71(1), 210–217. Retrieved from <http://jfoodprotection.org/doi/pdfplus/10.4315/0362-028X-71.1.210?code=fopr-site>
- YANG, D. Y., CANNON, A., SAUNDERS, S. R. (2004). DNA species identification of archaeological salmon bone from the Pacific Northwest Coast of North America. *Journal of Archaeological Science*, 31, 619–631. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2003.10.008>
- ZEMLAK, T. S., WARD, R. D., CONNELL, A. D., HOLMES, B. H., & HEBERT,

P. D. N. (2009). DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9, 237–242. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02649.x>

ZHANG, J., HUANG, H., CAI, Z., HUANG, L. (2006). Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. *Food Control*, 17(7), 557–563. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2005.01.011>

ZHANG, J., HUANG, L., HUO, H. (2004). Larval identification of Lutjanus Bloch in Nansha coral reefs by AFLP molecular method. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298(1), 3–20. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00341-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00341-1)

ZHANG, J., WANG, H., CAI, Z. (2007). The application of DGGE and AFLP-derived SCAR for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Control*, 18(6), 672–676. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2006.02.015>

INTERNETES HIVATKOZÁSOK:

WEB 1: www.fishbase.org;

<http://www.fishbase.org/Nomenclature/ScientificNameSearchList.php?>

<http://www.fishbase.org/identification/SpeciesList.php?genus=Ameiurus>

WEB 2.: Integrated Taxonomic Information System

<https://www.itis.gov/>

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=164034#null.

WEB 3.: www.fishbol.org

WEB4.: Észak-Amerika vízrajz térképe:

<https://sporcle.com/games/QuizTest/north-american-rivers-picture-click>

WEB 5.: Geospiza weboldal:

http://jblseqdat.bioc.cam.ac.uk/gnmweb/download/soft/FinchTV_1.4/doc/

M2. táblázat: A magyarországi mintavételi területekről gyűjtött törpeharcsa egyedek morfológiai bélyegeinek felvétele

A tőserdei 50 egyed és a vajai 75 egyed fotódokumentációban van.

Mintaszám	Helyszín	Faj (feltételezhetően)	Ivar	Szín	Mellúszótüske fogazottság	Áll alatti bajusz	Úszósugárszám	Pöttyözöttség	Oldalvonal
1.	Adács tározó	A. melas	♂	sárga has, sárgásbarna	belülről 1/3 nem,utána fogazott,	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
2.	Adács	A. melas	♂	sárga has, sárgásbarna	belülről 1/3 nem,utána fogazott,	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
3.	Adács	A. melas	♂	sárga has, sárgásbarna	belülről 1/3 nem,utána fogazott,	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
4.	Pilisvörösvár tó	hibrid	♂	zöldes sárga, sárga-fehér has	közép fogazott	világos	F:20;FA:17;H:7	Æ	nem szab.
5.	Pilisvörösvár	hibrid	♂	sárga has, sárgásbarna	közép fogazott	világos	F:18;FA:18;H:7	Æ	pötty.felétő 1
6.	Pilisvörösvár	hibrid	♀	sötétzöld, sárgás has	belseje, közép fogazott	sárgás	F:18;FA:18;H:7	Æ	pötty.felétő 1
7.	Pilisvörösvár	hibrid	♂	sárgásbarna, sárga has	nagyobb arányban fogazott	világos	F:20; FA:18; H:7	Æ	pötty.felétő 1
8.	Pilisvörösvár	hibrid	♂	sárgásbarna, sárga has	majdnem végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
9.	Pilisvörösvár	hibrid	♀	zöldes sárga, sárga-fehér has	majdnem végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
10.	Pilisvörösvár	hibrid	♂	zöldes sárga, sárga-fehér has	végig fogazott	sötét	F:20;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
11.	Pilisvörösvár	hibrid	♂	zöldes barna, sárga-fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
12.	Pilisvörösvár	hibrid	♂	zöldesbarna, sárgás has	végig fogazott	világos	F:19;FA:17;H:7	Æ	pötty.felétő 1
13.	Pilisvörösvár	hibrid	♀	sárgásbarna, sárga has, zöldes oldal	végig fogazott	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
14.	Pilisvörösvár	hibrid	♂	zöldesbarna, sárgás has	majdnem végig fogazott	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
15.	Pilisvörösvár	hibrid	♀	zöldesbarna, sárgás has	végig fogazott	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

16.	Pilisvörösvár	hibrid	♀	zöldesbarna, sárgás has	végig fogazott	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
17.	Adács	hibrid	♀	zöldes, sárga has	belülről 1/3 nem,utána fogazott,	világos	F:18;FA:21;H:7	Æ	pötty.felétő 1
18.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, sárga has	majdnem végig fogazott	világos	F:18;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
19.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, sárgás fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:19;H:7	oldv.fölött	pötty.felétő 1
20.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, sárga has	végig fogazott	világos	F:18;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
21.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, sárgás fehér has	belülről 1/3 nem,utána fogazott,	világos	F:19;FA:20;H:7	oldv.fölött	szab.
22.	Adács	hibrid	♀	olajzöld, sárgás-fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:20;H:8	Æ	szab.
23.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, sárgás fehér has	belülről 1/3 nem,utána fogazott,	világos	F:21;FA:21;H:7	Æ	szab.
24.	Adács	hibrid	♂	sárgászöld, sárgásfehér has	1/3 nem, 2/3 fogazott	világos	F:20;FA:22;H:8	Æ	pötty.felétő 1
25.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, sárgás fehér has	végig fogazott	világos	F:18;FA:19;H:7	oldv.fölött	szab.
26.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
27.	Adács	hibrid	♀	sárgászöld, sárgásfehér has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	világos	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
28.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, sárgás fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
29.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, sárgás fehér has	1/3 nem, 2/3 fogazott	fekete	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
30.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, sárga has	végig fogazott	világos	F:18;FA:21;H:7	Æ	szab.
31.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, sárga has	végig fogazott	világos	F:18;FA:20;H:7	oldv.fölött	szab.
32.	Adács	hibrid	♂	olajzöld, sárgás has	1/3 nem, 2/3 fogazott	világos	F:19;FA:20;H:7	foltos	szab.
33.	Adács	hibrid	♀	olajzöld, sárgás has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	világos	F:20;FA:20;H:7	foltos	szab.
34.	Adács	hibrid	♀	olajzöld, sárgás has	végig fogazott	sötét	F:18;FA:20;H:7	Æ	szab.
35.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, sárga has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
36.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

37.	Adács	hibrid	♂	sötétzöld, fehér has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	sötét	F:18;FA:19;H:7	Æ	szab.
38.	Adács	hibrid	♀	sötétzöld, barnás, has fehér	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
39.	Adács	hibrid	♀	sötétzöld, barnás, has fehér	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	pötty.felétő 1
40.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, sárga has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	sötét	F:19;FA:20;H:7	Æ	pötty.felétő 1
41.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, sárga has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	sötét	F:19;FA:20;H:7	Æ	pötty.felétő 1
42.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, sárga has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	sötét	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
43.	Adács	hibrid	♂	olajzöld, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
44.	Adács	hibrid	♂	olajzöld, sárgás-fehér has	1/3 nem, 2/3 fogazott	sötét	F:19;FA:20;H:7	oldv.fölött	szab.
45.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, sárga has	végig fogazott	világos	F:18;FA:20;H:7	Æ	szab.
46.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, fehér has	1/3 nem, 2/3 fogazott	sötét	F:19;FA:19;H:7	oldv.fölött	szab.
47.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, fehér has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	világos	F:20;FA:17;H:7	Æ	szab.
48.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, fehér has	végig fogazott	sötét	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
49.	Adács	hibrid	♂	zöld oldal, sárga has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	világos	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
50.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, fehér has	végig fogazott	sötét	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
51.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, fehér has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	sötét	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
52.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, fehér has	végig fogazott	sötét	F:20;FA:20;H:7	oldv.fölött	szab.
53.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:20;H:7	oldv.fölött	szab.
54.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, fehér has	majdnem végig fogazott	sötét	F:19;FA:20;H:7	oldv.fölött	szab.
55.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, sárgás-fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
56.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, hófehér has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	sötét	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
57.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, sárgás-fehér has	végig fogazott	sötét	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

58.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, fehér has	végig fogazott	világos	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
59.	Adács	hibrid	♂	zöldessárga, fehér has	végig fogazott	sötét	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
60.	Adács	hibrid	♀	zöldessárga, fehér has	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	világos	F:21;FA:19;H:7	Æ	nincs ov.
61.	Adács	hibrid	♀	sötétzöld, has fehér	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	hosszú fekete	F:18;FA:19;H:7	Æ	nincs ov.
62.	Adács	hibrid	♀	sötétzöld, has fehér	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	világos	F:20;FA:21;H:7	Æ	szab.
63.	Adács	hibrid	♀	sötétzöld, has fehér	végig fogazott	világos	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
64.	Adács	hibrid	♀	sötétzöld, has fehér	végig fogazott	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
65.	Adács	hibrid	♀	sötétzöld, has fehér	végig fogazott	fekete	F:19;FA:21;H:7	oldv.fölött	szab.
66.	Adács	A.melas	♂	sötétzöld, has fehér	1/3 nem,1/3 fogazott, 1/3 nem	sötét	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
67.	Adács	A.melas	♀	zöldessárga, sárgás-fehér has	végig fogazott	sötét	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
68.	Adács	A.melas	♂	zöldessárga, sárgás-fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
69.	Adács	A.melas	♀	zöldessárga, sárgás-fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
70.	Gyomaendrőd Hármas Körös	A.neb.	♀	zöldessárga, sárgás-fehér has	végig fogazott	világos	F:18;FA:17;H:7;M:8	Æ	szab.
71.	Gyomaendrőd	A.neb.	♂	olajzöld, sárga has	majdnem végig fogazott	világos	F:18;FA:20;H:7	Æ	szab.
72.	Gyomaendrőd	A.neb.	♀	zöldessárga, fehér has	végig fogazott	világos	F:18;FA:17;H:7	Æ	szab.
73.	Gyomaendrőd	A.neb.	♀	olajzöld, sárga has, világos úszók	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
74.	Gyomaendrőd	A. melas	♂	zöldes, füstös úszók, fehér has	alig közép 1/3 fogazott	hosszú világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
75.	Gyomaendrőd	A.neb.	♂	zöldes, füstös úszók, fehér has	végig fogazott	sötét	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
76.	Gyomaendrőd	A.neb.	♀	olajzöld, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
77.	Gyomaendrőd	hibrid	♂	olajzöld, fehér has	végig fogazott	világos	F:18;FA:19;H:7	Æ	szab.
78.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
79.	Dénesmajor GyulaKörös	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
80.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét	F:18;FA:19;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

81.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:17;FA:15;H:7	Æ	szab.
82.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	fekete	F:19;FA:16;H:7	Æ	szab.
83.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	fekete	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
84.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
85.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
86.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
87.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét, szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
88.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét, szürke	F:18;FA:17;H:7	Æ	szab.
89.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	fekete	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
90.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét, szürke	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
91.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét, szürke	F:17;FA:18;H:7	Æ	szab.
92.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét, szürke	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
93.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét	F:18;FA:18;H:7	Æ	szab.
94.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
95.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:18;FA:18;H:7	Æ	szab.
96.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
97.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:18;FA:18;H:7	Æ	szab.
98.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	sötét, szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
99.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:17;FA:17;H:7	Æ	szab.
100.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke has	végig fogazott	sötét, szürke	F:20;FA:17;H:7	Æ	szab.
101.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
102.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
103.	Dénesmajor	A.melas	♂	fekete, szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:18;FA:18;H:7	Æ	szab.
104.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:18;FA:18;H:7	Æ	szab.
105.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, fehér-szürke, fehér has	végig fogazott	sötét, szürke	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
106.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	sötét, szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
107.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	sötét	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
108.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
109.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:23;FA:17;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

110.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	világos-szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
111.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
112.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
113.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
114.	Dénesmajor	A.melas	♀	fekete, fehér-szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
115.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
116.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
117.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:21;FA:18;H:7	Æ	szab.
118.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	sötét	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
119.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
120.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
121.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
122.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
123.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	sötét	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
124.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
125.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürke has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
126.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
127.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	sötét	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
128.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	barnás	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
129.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
130.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	sötét	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
131.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:17;H:7	Æ	szab.
132.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:18;H:7	Æ	szab.
133.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
134.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
135.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
136.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
137.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
138.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

139.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
140.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
141.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
142.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
143.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	fekete	F:22;FA:17;H:7	Æ	szab.
144.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürke has	végig fogazott	szürke	F:22;FA:17;H:7	Æ	szab.
145.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:18;FA:17;H:7	Æ	szab.
146.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
147.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:17;FA:19;H:7	Æ	szab.
148.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
149.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
150.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
151.	Jászsági-csatorna	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:19;FA:20;H:7	van	szab.
152.	Jászsági-csatorna Tisza	hibrid	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	sötét-szürke	F:20;FA:19;H:7	van	szab.
153.	Jászsági-csatorna	A.melas	♂	szürke, szürke has	végig fogazott	fekete	F:20;FA:19;H:7	van	szab.
154.	Jászsági-csatorna	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	fekete	F:18;FA:21;H:7	van	szab.
155.	Jászsági-csatorna	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	fekete	F:20;FA:19;H:7	van	szab.
156.	Jászsági-csatorna	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	fekete	F:20;FA:19;H:7	van	szab.
157.	Békéscsaba	A.melas	♂	szürke, fehér has	majdnem végig fogazott	szürke	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
158.	Békéscsaba Kettős Körös	A.melas	♀	szürke, fehér has	majdnem végig fogazott	szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
159.	Békéscsaba	A.melas	♀	szürke, fehér has	ut.1/3 nem fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
160.	Békéscsaba	A.melas	♂	szürke, fehér has	ut.1/3 nem fogazott	világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
161.	Békéscsaba	A.melas	♂	szürke, fehér has	ut.1/3 nem fogazott	szürke, világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
162.	Békéscsaba	A.melas	♀	szürke, fehér has	ut.1/3 nem fogazott	szürke, világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
163.	Békéscsaba	A.melas	♀	szürke, fehér has	ut.1/3 nem fogazott	szürke, világos	F:19;FA:19;H:7	Æ	szab.
164.	Békéscsaba	A.melas	♀	szürke, fehér has	ut.1/3 nem fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
165.	Békéscsaba	A.melas	♀	szürke, fehér has	ut.1/3 nem fogazott	szürke	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

166.	Békéscsaba	A.melas	♀	szürke, fehér has	ut.1/3 nem fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
167.	Békéscsaba	A.melas	♂	szürke, fehér has	ut.1/3 nem fogazott	szürke	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
168.	Dénesmajor Fehér Körös folyó	A.melas	?	szürke, fehér has	végig fogazott	sötét-szürke	F:18;FA:19;H:7	Æ	szab.
169.	Dénesmajor	A.melas	♀?	szürke, fehér has	végig fogazott	világos-szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
170.	Dénesmajor	A.melas	♂?	szürke, fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
171.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	fekete	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
172.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	világos	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
173.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:18;H:7	Æ	szab.
174.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	szürke	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
175.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
176.	Dénesmajor	A.melas	♂?	szürke, szürkés has	első 1/3 fogazott, utána nem	szürke	F:21;FA:17;H:7	Æ	szab.
177.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürkés has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:17;H:7	Æ	szab.
178.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	első 1/3nem, utána fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
179.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:17;H:7	Æ???	szab.
180.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	első 1/3nem, utána fogazott	szürke	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
181.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
182.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
183.	Dénesmajor	hibrid	♂	szürke, fehér has	középen fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
184.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	utolsó 1/3-án NEM fogazott	szürke	F:21;FA:17;H:7	Æ	szab.
185.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	világos	F:21;FA:18;H:7	Æ	szab.
186.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	fekete	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
187.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	fekete	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
188.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	fekete	F:21;FA:17;H:7	Æ	szab.
189.	Dénesmajor	A.melas	♂?	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	fekete	F:21;FA:18;H:7	Æ	szab.
190.	Dénesmajor	hibrid	♂?	szürke, márványozott, sz-fehér has	végig fogazott	világos	F:18;FA:17;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

191.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürkés has	utolsó 1/3-án NEM fogazott	világos	F:20;FA:17;H:7	Æ	szab.
192.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:16;H:7	Æ	szab.
193.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
194.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	fekete	F:20;FA:17;H:7	Æ	szab.
195.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	szürke	F:21;FA:17;H:7	Æ	szab.
196.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	fekete	F:20;FA:17;H:7	Æ	szab.
197.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	fekete	F:19;FA:16;H:7	Æ	szab.
198.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürke-fehér has	végig fogazott	fekete	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
199.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, márványozott végig	végig fogazott	fekete	F:20;FA:17;H:7	Æ	szab.
200.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	enyhén végig fogazott	világos-szürke	F:20;FA:16;H:7	Æ	szab.
201.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, márványozott, sz-fehér has	utolsó 1/3-án NEM fogazott	fehéres-szürke	F:20;FA:17;H:7	Æ	szab.
202.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, fehér has	végig fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
203.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, szürkés has	első 1/3 nem fogazott	szürke	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
204.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, szürkés has	végig fogazott	fekete	F:20;FA:17;H:7	Æ	szab.
205.	Dénesmajor	A.melas	?	szürke, szürkés has	végig fogazott	szürke	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
206.	Dénesmajor	A.melas	♀	szürke, márványozott, sz-fehér has	középen fogazott	szürke	F:21;FA:18;H:7	Æ	szab.
207.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, fehér has	csak a vége fogazott	fekete	F:19;FA:16;H:7	Æ	szab.
208.	Dénesmajor	A.melas	♂	szürke, márványozott, fehér has	végig fogazott	fekete	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
209.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal	végig fogazott	fekete	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
210.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátoldal is	koromfekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
211.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátoldal enyhén	koromfekete	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
212.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	alig fogazott, hátoldal NEM	koromfekete	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
213.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	középen fogazott	fekete	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

214.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	középen fogazott	sötét	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
215.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	korom- fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
216.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott	fekete	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
217.	Pécs-Dráva	hibrid	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	középen fogazott	sötét	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
218.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
219.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	fekete	F:22;FA:20;H:7	Æ	szab.
220.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott	sötét	F:19;FA:17;H:7	Æ	szab.
221.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	korom- fekete	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
222.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	korom- fekete	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
223.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	korom- fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
224.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
225.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete, márv. hát, olajzöld o., fehér has	végig fogazott, hátdal is	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
226.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	fekete	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
227.	Pécs-Dráva	hibrid	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	középen fogazott	fekete	F:21;FA:20;H:7	van	szab.
228.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	fekete	F:22;FA:20;H:7	Æ	szab.
229.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott	világos	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
230.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	fekete	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
231.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
232.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátdal is	fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

233.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	fekete	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
234.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
235.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott	fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
236.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	világoszöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	fekete	F:19;FA:20;H:7	Æ	szab.
237.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	világoszöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	fekete	F:22;FA:20;H:7	Æ	szab.
238.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	fekete	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
239.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal enyhén	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
240.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	fekete	F:18;FA:19;H:7	Æ	szab.
241.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal enyhén	fekete	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
242.	Pécs-Dráva	hibrid	♀	zöld oldal, fehér has	végig fogazott	világos- barna	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
243.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
244.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott	világos- barna	F:18;FA:20;H:7	Æ	szab.
245.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal,fehér has	végig fogazott	korom- fekete	F:21;FA:23;H:7	Æ	szab.
246.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	világos	F:21;FA:21;H:7	Æ	szab.
247.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	fekete	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
248.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	korom- fekete	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
249.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
250.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:18;H:7	Æ	szab.
251.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, háttoldal is	korom- fekete	F:23;FA:19;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

252.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hátoldal is	világos barna	F:24;FA:20;H:7	Æ	szab.
253.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	korom-fekete	F:22;FA:20;H:7	van	szab.
254.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátoldal is	világos fekete	F:22;FA:19;H:7	van	szab.
255.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	középen fogazott	szürke	F:21;FA:21;H:7	Æ	szab.
256.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátoldal is	világos fekete	F:24;FA:19;H:7	Æ	szab.
257.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátoldal enyhén	világos	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
258.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátoldal enyhén	világos	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
259.	Pécs-Dráva	A.melas	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hátoldal enyhén	fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
260.	Pécs-Dráva	A.melas	♂	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
261.	Lőrinci-Hatvan Zagyva	hibrid	♂	zöld oldal, fehér has	végig fogazott	világos	F:23;FA:18;H:7	Æ	szab.
262.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:20;H:7	Æ	szab.
263.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:19;H:7	van	szab.
264.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:20;H:7	van	szab.
265.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:20;FA:20;H:7	van	szab.
266.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
267.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:20;H:7	van	szab.
268.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:18;H:7	van	szab.
269.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:19;H:7	van?	szab.
270.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:20;H:7	van	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

271.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:19;H:7	van	szab.
272.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:19;FA:20;H:7	van?	szab.
273.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:23;FA:18;H:7	van?	szab.
274.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát enyhén	világos	F:21;FA:19;H:7	van?	szab.
275.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát érdes	világos	F:21;FA:20;H:7	van?	szab.
276.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:19;H:7	van?	szab.
277.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:21;FA:21;H:7	Æ	szab.
278.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
279.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát érdes	fekete	F:23;FA:19;H:7	Æ	alig látszik
280.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
281.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:19;H:7	van?	szab.
282.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát érdes	világos	F:23;FA:19;H:7	van?	szab.
283.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:21;H:7	Æ	szab.
284.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:18;H:7	oldv-mentén	szab.
285.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, hófehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:18;H:7	van?	szab.
286.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, hófehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:20;H:7	van?	szab.
287.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, hófehér has	elején fogazott, végén nem	fekete	F:22;FA:21;H:7	Æ	szab.
288.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	zöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:20;H:7	van	szab.
289.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	fekete hát, olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos barna	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

290.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát sima	világos barna	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
291.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, sárgás-fehér has	végig fogazott, hát érdes	fekete	F:19;FA:18;H:7	Æ	szab.
292.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:20;H:7	Æ	szab.
293.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	elején fogazott, végén nem	fekete	F:23;FA:19;H:7	Æ	szab.
294.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos fekete	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
295.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
296.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:20;H:7	Æ	szab.
297.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
298.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát érdes	világos	F:21;FA:20;H:7	van?	szab.
299.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
300.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:23;FA:20;H:7	Æ	szab.
301.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:21;H:7	Æ	szab.
302.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát érdes	világos barna	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
303.	Lőrinci-Hatvan	A.melas	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:21;H:7	Æ	szab.
304.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát érdes	világos	F:22;FA:21;H:7	Æ	szab.
305.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
306.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:20;H:7	Æ	szab.
307.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:19;H:7	Æ	alig látszik
308.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:20;H:7	Æ	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

309.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
310.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	elején fogazott, végén nem	világos	F:23;FA:19;H:7	Æ	szab.
311.	Lőrinci-Hatvan	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	elején fogazott, végén nem	világos	F:22;FA:19;H:7	van	szab.
312.	Mohács-Külső Béda Duna	hibrid	♂	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott	sötét	F:22;FA:19;H:7	van	szab.
313.	Mohács-Külső Béda	hibrid	♀	olajzöld hát, fehér has	végig fogazott	fekete	F:22;FA:19;H:7	van	szab.
314.	Mohács-Külső Béda	hibrid	♀	olajzöld oldal, sárgás-fehér has	végig fogazott	koromfekete	F:22;FA:20;H:7	van	szab.
315.	Mohács-Külső Béda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott	sötét	F:22;FA:19;H:7	van	szab.
316.	Mohács-Külső Béda	A.melas.	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:20;FA:20;H:7	Æ	szab.
317.	Mohács-Külső Béda	A.neb.	♀	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát érdes	világos	F:20;FA:19;H:7	van	szab.
318.	Mohács-Külső Béda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:18;FA:20;H:7	Æ	szab.
319.	Mohács-Külső Béda	A.melas	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:21;FA:21;H:7	oldv.fölött	szab.
320.	Mohács-Külső Béda	A.neb.	♂	világosbarna, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:20;H:7	van	szab.
321.	Mohács-Külső Béda	A.melas	♀	világosbarna, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:20;FA:21;H:7	van	szab.
322.	Mohács-Külső Béda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:21;FA:19;H:7	van	szab.
323.	Mohács-Külső Béda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	középen fogazott	világos	F:20;FA:23;H:7	van	szab.
324.	Mohács-Külső Béda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:18;H:7	van	szab.
325.	Mohács-Külső Béda	A.melas	♂	sötétzöld, has sárgás-fehér	végig fogazott, hát érdes	koromfekete	F:20;FA:19;H:7	van	szab.
326.	Mohács-Külső Béda	hibrid	♀	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:20;H:7	Æ	szab.
327.	Mohács-Külső Béda	A.neb.	♀	sötétzöld, has sárgás-fehér	végig fogazott, hát sima	világos	F:20;FA:20;H:7	van	szab.

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

328.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♀	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:18;FA:20;H:7	Æ	szab.
329.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♀	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:20;FA:18;H:7	Æ	szab.
330.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	sötét	F:21;FA:19;H:7	oldv.fölött	szab.
331.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.
332.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♀	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:21;H:7	oldv.fölött	szab.
333.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:19;H:7	van	szab.
334.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♀	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:19;H:7	van	szab.
335.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	középen fogazott	világos	F:21;FA:21;H:7	van	szab.
336.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♀	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:22;FA:18;H:7	van	szab.
337.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:21;FA:19;H:7	van	szab.
338.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:20;H:7	Æ	szab.
339.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♀	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:21;FA:19;H:7	Æ	szab.
340.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♀	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	világos	F:22;FA:19;H:7	Æ	szab.
341.	Mohács-Külső BÉda	hibrid	♂	olajzöld oldal, fehér has	végig fogazott, hát sima	fekete	F:20;FA:19;H:7	Æ	szab.

M3. táblázat: Élőhelyenkénti fenotípus és genotípus összehasonlítása, valamint az egyik legfontosabb határozóbélyeg, az úszósugárszámok összesítő adatai és az ivarösszesítés

Mintavételi helyek	Egyedszám	Faj	Fenotípus	Genotípus		Úszósugárszám (átlag±szórás)			♀	♂
				Multiplex	Mitokondriális	Farokúszó	Farok alatti	Hátúszó		

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

				PCR-	szekvenálás COI		úszó					
Adács	56	<i>A. nebulosus</i>	3			19,25 ± 0,86	19,68 ± 0,78	7,00 ± 0,19	31	55,36%	25	44,64%
		<i>A. melas</i>	7	56	15							
		hibrid	46									
Pilisvörösvár	13	hibrid	13			19,31 ± 0,78	18,46 ± 0,78	7,00 ± 0,00	5	38,46%	8	61,54%
		<i>A. melas</i>		13	7							
Gyomaendrőd	8	<i>A. nebulosus</i>	6			18,75 ± 0,89	18,38 ± 1,06	7,00 ± 0,00	4	50%	4	50%
		<i>A. melas</i>	1	8	8							
		hibrid	1									
Jászsági-csatorna	6	<i>A. melas</i>	5	6	5	19,50 ± 0,84	19,50 ± 0,84	7,00 ± 0,00	3	50%	3	50%
		hibrid	1		1							
Békéscsaba	11	<i>A. melas</i>	11	11	9	19,55 ± 0,52	18,45 ± 0,82	7,00 ± 0,00	7	63,63%	4	36,37%
Dénesmajor Fehér-Körös	114	<i>A. melas</i>	112	114	28	19,75 ± 1,13	18,01 ± 1,02	7,00 ± 0,00	53	46,49%	61	53,51%
		hibrid	2									
Pécs Dráva	52	<i>A. melas</i>	48	52	14	20,75 ± 1,25	19,54 ± 0,87	7,00 ± 0,00	22	42,31%	30	57,69%
		hibrid	4									
Lőrinci Hatvan	51	<i>A. melas</i>	1	51	15	21,61 ± 0,92	19,41 ± 0,85	7,00 ± 0,00	31	60,78%	20	39,22%
		hibrid	50									
Mohács Külső- Béda	30	<i>A. nebulosus</i>	4			20,93 ± 1,17	19,57 ± 1,07	7,00 ± 0,00	13	43,33%	17	56,67%
		<i>A. melas</i>	3	30	11							
		hibrid	23									
Vaja	75	<i>A. nebulosus</i>	18	19	18	19,58 ± 0,90	19,25 ± 0,97	7,08 ± 0,29	9	50%	9	50%
		<i>A. melas</i>	57	56	17	21,02 ± 0,91	19,90 ± 1,20	7,00 ± 0,00	34	59,64%	23	40,36%
Tőserdő	50	<i>A. nebulosus</i>	20	19	17	20,25 ± 0,97	19,55 ± 0,60	7,25 ± 0,44	8	47,06%	9	52,94%
		<i>A. melas</i>	30	29	7	20,30 ± 0,61	19,97 ± 0,83	7,03 ± 0,18	11	36,66%	19	63,34%
		hibrid			3	19,33 ± 0,58	19,67 ± 0,58	7,00 ± 0,00	1	33,33%	2	66,67%

M4. táblázat: Genotípusok szekvenálás után az egyes mintavételi helyeken

Mintavételi helyek	Egyedszám	Faj	Fenotípus	FAJ MULTIPLEX PCR-rel (P5_F+Neb_F; 16sbrH_59_F+Ne b_R)	Genotípus Faj szekvenálás után COI	Ivar			
						♀		♂	
Adács	56	<i>A. nebulosus</i>	3			31	55,36%	25	44,64 %
		<i>A. melas</i>	7	56	15				
		hibrid	46						
Pilisvörösvár	13	hibrid	13			5	38,46%	8	61,54 %
		<i>A. melas</i>		13	7				
Gyomaendrőd	8	<i>A. nebulosus</i>	6			4	50%	4	50%
		<i>A. melas</i>	1	8	8				
		hibrid	1						
Jászsági-csatorna	6	<i>A. melas</i>	5	6	5	3	50%	3	50%
		hibrid	1		1				
Békéscsaba	11	<i>A. melas</i>	11	11	9	7	63,63%	4	36,37 %
Dénesmajor Fehér-Körös	114	<i>A. melas</i>	112	114	28	53	46,49%	61	53,51 %
		hibrid	2						
Pécs Dráva	52	<i>A. melas</i>	48	52	14	22	42,31%	30	57,69 %
		hibrid	4						
Lőrinci Hatvan	51	<i>A. melas</i>	1	51	15	31	60,78%	20	39,22 %
		hibrid	50						
Mohács Külső-Béda	30	<i>A. nebulosus</i>	4			13	43,33%	17	56,67 %
		<i>A. melas</i>	3	30	11				
		hibrid	23						
Vaja	75	<i>A. nebulosus</i>	18	19	18	9	50%	9	50%

		<i>A. melas</i>	57	56	17	34	59,64%	23	40,36%
Töserdő	50	<i>A. nebulosus</i>	20	19	17	8	47,06%	9	52,94%
		<i>A. melas</i>	30	29	7	11	36,66%	19	63,34%
		hibrid			3	1	33,33%	2	66,67%

M5. táblázat: Az amerikai minták szekvencia-vizsgálata

Helyszín	Egyed mintaszám	Primer	Faj szekvenálás után
USA	TÖ_US_3	FF 2d F	<i>A. nebulosus</i>
		16sarL 59 F	<i>A. nebulosus</i>
	TÖ_US_5	FF 2d F	
		16sarL 59 F	<i>A. nebulosus</i>
	TÖ_US_6	16sarL 59 F	<i>A. nebulosus</i>
		FF 2d F	
	TÖ_US_21	16sarL 59 F	<i>A. melas</i>
		FF 2d F	<i>A. melas</i>
	TÖ_US_22	16sarL 59 F	<i>A. melas</i>
		FF 2d F	<i>A. melas</i>
	TÖ_US_25	16sarL 59 F	<i>A. melas</i>
		FF 2d F	<i>A. melas</i>
TÖ_US_41	16sarL 59 F	<i>A. natalis</i>	
	FF 2d F	<i>A. natalis</i>	
TÖ_US_43	16sarL 59 F	<i>A. natalis</i>	

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

	FF 2d F	<i>A. natalis</i>
TÖ_US_44	16sarL 59 F	<i>A. natalis</i>
	FF 2d F	<i>A. natalis</i>
	TÖ_US 3/2.	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 5/2.	CytB L 14724F	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 21/2.	CytB L 14724F	<i>A. melas</i>
TÖ_US 22/2.	CytB L 14724F	<i>A. melas</i>
TÖ_US 3/2.	CytB L 14724F	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 5/2.	CytB L 14724F	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 21/2.	CytB L 14724F	<i>A. melas</i>
TÖ_US 22/2.	CytB L 14724F	<i>A. melas</i>
TÖ_US 28/2.	CytB L 14724F	<i>A. melas</i>
TÖ_US 41.	CytB L 14724F	<i>A. natalis</i>
TÖ_US 43.	CytB L 14724F	<i>A. natalis</i>
TÖ_US 3/2.	CytB L 14724F	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 5/2.	CytB L 14724F	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 6/2.	CytB L 14724F	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 22/2.	CytB L 14724F	<i>A. melas</i>
TÖ_US 25/2.	CytB L 14724F	<i>A. melas</i>
TÖ_US 3/1.	CytB L 14724F	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 3/1.	CytB L 14724F	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 21/1.	CytB L 14724F	<i>A. melas</i>
TÖ_US 25/2.	T7	<i>A. melas</i>
TÖ_US 26/2.	T7	<i>A. melas</i>
TÖ_US 7/1.	T7	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 8/2.	SP6	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_US 7/2.	SP6	<i>A. nebulosus</i> ,
TÖ_US 25/2.	SP6	<i>A. melas</i>

	TÖ_US_26/2.	SP6	<i>A. melas</i>
	TÖ_US_6/2.	SP6	<i>A. nebulosus</i>
	TÖ_US_7/1.	SP6	<i>A. nebulosus</i>

M6. táblázat: A magyarországi élőhelyekről származó törpeharcsák szekvencia-vizsgálata

Egyed mintaszám	Szekvencia mintaszám	Primer	Gén	Értékelhető szekvencia fájl	Faj
TÖ_213	1	12s-I-1-F	ribosomal RNA gene	BeBea_1_01_8-4-08-4-09 PM.ab1	
	2	16sarL_59_F	16S ribosomal RNA gene	BeBea_1_02_8-4-08-4-56 PM.ab1	<i>A. melas</i>
	3	P7_F	cytochrome oxidase subunit I (COI) gene	BeBea_1_03_8-4-08-5-40 PM.ab1	<i>A. melas</i>
	4	FF_2d_F	(COI) gene	BeBea_1_04_8-5-08-3-55 AM.ab1	<i>A. melas</i>
TÖ_215	7	12s-I-1-F	12S	BeBea_1_07_8-4-08-7-14 PM.ab1	
	8	16sarL_59_F	16S ribosomal RNA gene	BeBea_1_08_8-4-08-8-02 PM.ab1	<i>A. melas</i>
	9	P7_F	cytochrome oxidase subunit I (COI) gene	BeBea_1_09_8-4-08-8-49 PM.ab1	<i>A. melas</i>
	10	FF_2d_F	cytochrome oxidase	BeBea_1_10_8-4-08-9-36 PM.ab1	<i>A. melas</i>
	12	CytB_L_14724F	cytochrome b (cytb)	BeBea_1_12_8-4-08-10-24 PM.ab1	<i>A. melas</i>
TÖ_70	13	12s-I-1-F	ribosomal RNA gene	BeBea_1_13_8-4-08-11-11 PM.ab1	
	14	16sarL_59_F	16S ribosomal RNA gene	BeBea_1_14_8-4-08-11-58 PM.ab1	<i>A. melas</i>
	15	P7_F	cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene	BeBea_1_15_8-5-08-12-46 AM.ab1	
	16	FF_2d_F	cytochrome oxidase	BeBea_1_16_8-5-08-11-57 AM.ab1	<i>A. melas</i>
	18	CytB_L_14724F	cytochrome b (cytb) gene	BeBea_1_18_8-5-08-11-15 AM.ab1	<i>A. melas</i>
TÖ_V_1.	TÖ_V_1.	FF_2d_F	COI	To-V-1_4-7-10-4-31 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_V_2.	TÖ_V_2.	FF_2d_F	COI	To-V-2_4-7-10-11-49 AM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_V_3.	TÖ_V_3.	FF_2d_F	COI	To-V-3-7-10-6-00 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_V_4.	TÖ_V_4.	FF_2d_F	COI	To-V-4_4-7-10-6-44 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

TÖ_V_5.	TÖ_V_5.	FF_2d_F	COI	To-V-5_4-7-10-7-29 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_V_6.	TÖ_V_6.	FF_2d_F	COI	To-V-6_4-7-10-2-18 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_V_10.	TÖ_V_10.	FF_2d_F	COI	To-V-10_4-7-10-3-03 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_V_11.	TÖ_V_11.	FF_2d_F	COI	To-V-11_4-7-10-3-47 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_V_15.	TÖ_V_15.	FF_2d_F	COI	to_v_15-4-16-10-3-15 PM.ab1	<i>A. melas</i>
TÖ_V_20.	TÖ_V_20.	FF_2d_F	COI	to_v_20-4-16-10-3-59 PM.ab1	<i>A.melas,</i>
TÖ_V_24.	TÖ_V_24.	FF_2d_F	COI	to_v_24-4-19-10-8-55 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_V_26.	TÖ_V_26.	FF_2d_F	COI	to_v_26-4-19-10-9-39 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_V_28.	TÖ_V_28.	FF_2d_F	COI	to_v_28-4-20-10-9-20 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_4.	TÖ_4.	FF_2d_F	COI	to_4-4-20-10-12-21 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_5.	TÖ_5.	FF_2d_F	COI	to_5-4-20-10-1-04 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_8.	TÖ_8.	FF_2d_F	COI	to_8-4-20-10-2-31 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_9.	TÖ_9.	FF_2d_F	COI	to_9-4-20-10-1-48 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_14.	TÖ_14.	FF_2d_F	COI	to_14-4-20-10-3-14 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_39.	TÖ_39.	FF_2d_F	COI	to_39-4-19-10-5-35 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_48.	TÖ_48.	FF_2d_F	COI	to_48-4-20-10-9-57 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_58.	TÖ_58.	FF_2d_F	COI	to_58-4-19-10-3-26 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_67.	TÖ_67.	FF_2d_F	COI	to_67-4-19-10-4-52 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_72.	TÖ_72.	FF_2d_F	COI	to_72-4-20-10-4-41 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_73.	TÖ_73.	FF_2d_F	COI	to_73-4-20-10-6-08 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_74.	TÖ_74.	FF_2d_F	COI	to_74-4-20-10-6-51 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_75.	TÖ_75.	FF_2d_F	COI	to_75-4-20-10-3-57 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_77.	TÖ_77.	FF_2d_F	COI	to_77-4-20-10-5-24 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_84.	TÖ_84.	FF_2d_F	COI	to_84-4-19-10-9-55 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_85.	TÖ_85.	FF_2d_F	COI	to_85-4-19-10-11-22 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_106.	TÖ_106.	FF_2d_F	COI	to_106-4-19-10-10-38 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_117.	TÖ_117.	FF_2d_F	COI	to_117-4-20-10-12-05 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_132.	TÖ_132.	FF_2d_F	COI	to_132-4-20-10-12-49 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_151.	TÖ_151.	FF_2d_F	COI	to_151-4-20-10-8-45 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_152.	TÖ_152.	FF_2d_F	COI	to_152-4-20-10-10-55 AM.ab1	<i>hidrid?</i>

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

TÖ_154.	TÖ_154.	FF_2d_F	COI	to_154-4-20-10-9-28 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_155.	TÖ_155.	FF_2d_F	COI	to_155-4-20-10-11-38 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_156.	TÖ_156.	FF_2d_F	COI	to_156-4-20-10-10-11 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_158.	TÖ_158.	FF_2d_F	COI	to_158-4-20-10-6-35 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_159.	TÖ_159.	FF_2d_F	COI	to_159-4-20-10-5-08 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_163.	TÖ_163.	FF_2d_F	COI	to_163-4-20-10-8-05 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_165.	TÖ_165.	FF_2d_F	COI	to_165-4-20-10-5-51 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_166.	TÖ_166.	FF_2d_F	COI	to_166-4-20-10-8-43 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_217.	TÖ_217.	FF_2d_F	COI	to_217-4-19-10-1-59 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_240.	TÖ_240.	FF_2d_F	COI	to_240-4-19-10-11-49 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_251.	TÖ_251.	FF_2d_F	COI	to_251-4-19-10-1-16 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_253.	TÖ_253.	FF_2d_F	COI	to_253-4-20-10-7-28 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_255.	TÖ_255.	FF_2d_F	COI	to_255-4-19-10-12-32 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_264.	TÖ_264.	FF_2d_F	COI	to_264-4-20-10-2-15 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_269.	TÖ_269.	FF_2d_F	COI	to_269-4-20-10-1-32 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_301.	TÖ_301.	FF_2d_F	COI	to_301-4-20-10-2-58 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_303.	TÖ_303.	FF_2d_F	COI	to_303-4-20-10-3-42 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_309.	TÖ_309.	FF_2d_F	COI	to_309-4-20-10-4-25 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_312.	TÖ_312.	FF_2d_F	COI	to_312-4-19-10-7-45 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_314.	TÖ_314.	FF_2d_F	COI	to_314-4-19-10-9-12 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_318.	TÖ_318.	FF_2d_F	COI	to_318-4-19-10-6-19 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_333.	TÖ_333.	FF_2d_F	COI	to_333-4-19-10-7-02 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_339.	TÖ_339.	FF_2d_F	COI	to_339-4-19-10-8-29 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_594.	TÖ_594.	FF_2d_F	COI	to_594-19-10-4-09 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_5.	TÖ_5.	FF_2d_F	COI	TO_5_5-11-10-9-11 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_6.	TÖ_6.	FF_2d_F	COI	TO_6_5-11-10-9-54 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_11.	TÖ_11.	FF_2d_F	COI	TO_11_5-11-10-10-38 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_13.	TÖ_13.	FF_2d_F	COI	TO_13_5-11-10-12-04 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_23.	TÖ_23.	FF_2d_F	COI	TO_23_5-11-10-5-34 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_27.	TÖ_27.	FF_2d_F	COI	TO_27_5-11-10-6-17 AM.ab1	

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

TÖ_47.	TÖ_47.	FF_2d_F	COI	TO_47_5-11-10-7-01 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_51.	TÖ_51.	FF_2d_F	COI	TO_51_5-11-10-7-44 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_68.	TÖ_68.	FF_2d_F	COI	TO_68_5-11-10-8-28 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_70.	TÖ_70.	FF_2d_F	COI	TO_70_5-17-10-10-54 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_76.	TÖ_76.	FF_2d_F	COI	TO_76_5-18-10-12-20 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_88.	TÖ_88.	FF_2d_F	COI	TO_88_5-17-10-11-21 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_101.	TÖ_101.	FF_2d_F	COI	TO_101_5-17-10-12-05 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_107.	TÖ_107.	FF_2d_F	COI	TO_107_5-17-10-10-11 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_122.	TÖ_122.	FF_2d_F	COI	TO_122_5-17-10-12-48 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_125.	TÖ_125.	FF_2d_F	COI	TO_125_5-11-10-11-21 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_139.	TÖ_139.	FF_2d_F	COI	TO_139_5-17-10-1-31 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_149.	TÖ_149.	FF_2d_F	COI	TO_149_5-17-10-2-15 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_152.	TÖ_152.	12s_F	mt 12S	TO_152_12s_F_5-17-10-5-51 PM.ab1	
TÖ_152.	TÖ_152.	12s_R	mt 12S	TO_152_12s_R_5-17-10-6-34 PM.ab1	
TÖ_152.	TÖ_152.	16s_F	mt 16S	TO_152_16s_F_5-17-10-4-24 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_152.	TÖ_152.	16s_R	mt 16S	TO_152_16s_R_5-17-10-5-08 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_152.	TÖ_152.	FF_2d_F	COI	TO_152_COI_F_5-17-10-2-58 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_152.	TÖ_152.	FF_2d_R	COI	TO_152_COI_R_5-17-10-3-41 PM.ab1	<i>A. nebulosus</i>
TÖ_157	TÖ_157	FF_2d_F	COI	TO_157_5-17-10-7-17 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_160	TÖ_160	FF_2d_F	COI	TO_160_5-17-10-8-01 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_161	TÖ_161	FF_2d_F	COI	TO_161_5-17-10-8-44 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_164	TÖ_164	FF_2d_F	COI	TO_164_5-17-10-9-27 PM.ab1	
TÖ_211	TÖ_211	FF_2d_F	COI	TO_211_5-11-10-1-58 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_242	TÖ_242	FF_2d_F	COI	TO_242_5-11-10-2-41 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_250	TÖ_250	FF_2d_F	COI	TO_250_5-11-10-3-25 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_254	TÖ_254	FF_2d_F	COI	TO_254_5-11-10-4-08 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_257	TÖ_257	FF_2d_F	COI	TO_257_5_5-11-10-4-51 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_267	TÖ_267	FF_2d_F	COI	TO_267_5-18-10-1-04 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_270	TÖ_270	FF_2d_F	COI	TO_270_5-18-10-1-47 AM.ab1	<i>A.melas</i>

11. MELLÉKLETEK - TÁBLÁZATOK

TÖ_273	TÖ_273	FF_2d_F	COI	TO_273_5-18-10-2-30 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_306	TÖ_306	FF_2d_F	COI	TO_306_5-18-10-3-13 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_307	TÖ_307	FF_2d_F	COI	TO_307_5-18-10-3-57 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_316	TÖ_316	FF_2d_F	COI	TO_316_5-11-10-12-47 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_317	TÖ_317	FF_2d_F	COI	TO_317_5-11-10-1-31 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_321	TÖ_321	FF_2d_F	COI	TO_321_5-11-10-2-14 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_335	TÖ_335	FF_2d_F	COI	TO_335_5-11-10-2-57 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_337	TÖ_337	FF_2d_F	COI	TO_337_5-11-10-3-40 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_V_35	TÖ_V_35	FF_2d_F	COI	TO_V_35_5-10-10-10-21 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_V_41	TÖ_V_41	FF_2d_F	COI	TO_V_41_5-10-10-11-05 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_V_44	TÖ_V_44	FF_2d_F	COI	TO_V_44_5-10-10-11-48 PM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_V_50	TÖ_V_50	FF_2d_F	COI	TO_V_50_5-11-10-12-31 AM.ab1	<i>A.melas</i>
TÖ_V_58	TÖ_V_58	FF_2d_F	COI	TO_V_58_5-11-10-1-15 AM.ab1	<i>A.melas</i>

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Kovács Balázsnak**, aki elindított ezen az úton, hitt bennem, ösztönzött és mindenre megtanított. Köszönetem szeretném továbbá kifejezni témavezetőmnek, **Dr. Urbányi Bélának**, aki mindvégig mellettem állt, és segítette a munkámat, valamint **Dr. Horváth László** professzor úrnak az iránymutatásért. Köszönöm a Halgazdákodási Tanszék és a Regionális Tudásközpont dolgozóinak, **Dr. Müller Tamásnak**, **Kánaniné Sipos Dórának**, **Dr. Csenki-Bakos Katalinnak**, **Dr. Farkas Milánnak**, **Dr. Staszny Ádámnak** a türelmet, segítséget és a kedves szavakat.

Vörös Juditnak és **Matskási Istvánnak**, akik a Magyar Természettudományi Múzeumban tárolt egyedekből mintákat biztosítottak.

Sallai Zoltánnak értékes tanácsaiért, mintavételezésben nyújtott önzetlen segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Hangping Wang** professzor úrnak az amerikai minták beszerzésében nyújtott segítségéért.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Mudriczki Juditnak** az angol nyelvű fordításban, lektorálásban nyújtott precíz, gondos munkájáért.

Emellett szeretnék köszönetet mondani a támogatásért az OTKA K105393 az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 és a GINOP-2.3.2-15-2016-00004 projekteknek.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani minden segítő kéznek, aki valamilyen módon hozzájárult kutatómunkám és dolgozatom elkészítésében. Hálával tartozom férjemnek, kisfiamnak, szüleimnek, testvéremnek és családjának, nagyszüleimnek, férjem családjának, barátaimnak a mérhetetlen türelemért, a támogatásért, a sokszor nehéz folytatáshoz erőt adó szavakért.