

Szent István Egyetem

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

Doktori (PhD) értekezés

Kánainé Sipos Dóra Ildikó

Gödöllő

2019.

A doktori iskola megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állat biotechnológia, molekuláris genetika az állattenyésztésben

Vezetője: Dr. Mézes Miklós

tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Kovács Balázs

tudományos főmunkatárs

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

*„A természet komoly kutatója nem tagadhatja Istent.” „Annak, aki mélyen belenézett
Isten műhelyébe, és alkalma volt megcsodálni az örök bölcsességet, térdet kell
hajtania a legmagasabb szellem előtt.”*

(Johann Heinrich von Mädler, csillagász, a Hold első feltérképezője)

Kálló Karola (1984-2015) és Riz Levente (1974-2019) emlékére.

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	5
JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	7
1. BEVEZETÉS.....	9
Célkitűzések.....	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1 Az akvakultúra növekvő jelentősége	11
2.2 Genetikai markerek alkalmazása az akvakultúrában	14
2.3 Mikroszatellit izolálási módszerek	23
2.3.1 Tradicionális izolálás	24
2.3.2 Új generációs szekvenálási módszeren alapuló izolálás	24
2.4 Genetikai markerek alkalmazása a populációk diverzitásának becslésében.....	25
2.5 A vizsgált fajok bemutatása	26
2.5.1 Süllő (<i>Sander lucioperca</i>).....	26
2.5.2 Sügér (<i>Perca fluviatilis</i>).....	28
2.5.3 Afrikai harcsa (<i>Clarias gariepinus</i>).....	37
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	43
3.1 Mintagyűjtés	43
3.2 DNS izolálás	43
3.3 Könyvtárkészítés.....	44
3.4 Szekvencia meghatározás és primer tervezés	48
3.5 Reakcióköörülmények optimalizálása	49
3.6 Mikroszatellit analízis.....	51
3.7 Populációgenetikai-, valamint markerek-jellemzéshez alkalmazott szoftverek	51
3.8 A fejlesztett mikroszatellitek PCR alapú kimutatásának multiplexálása	52
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	54
4.1 Süllő (<i>Sander lucioperca</i>).....	54
4.1.1 Könyvtárkészítés.....	54
4.1.2 Az újonnan fejlesztett markerek jellemzése.....	54
4.1.3 Populációgenetikai analízis.....	54
4.1.4 A multiplex PCR optimalizálás eredményei.....	62
4.2 Sügér (<i>Perca fluviatilis</i>).....	63
4.2.1 Könyvtárkészítés.....	63
4.2.2 Az újonnan fejlesztett markerek jellemzése.....	63
4.2.3 Populációgenetikai analízis.....	64
4.3 Afrikai harcsa (<i>Clarias gariepinus</i>).....	68
4.3.1 Könyvtárkészítés.....	68
4.3.2 Az újonnan fejlesztett afrikai harcsa markerek jellemzése	69

5.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	70
6.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	71
6.1	Könyvtárkészítés	71
6.2	Süllő (<i>Sander lucioperca</i>).....	71
6.3	Sügér (<i>Perca fluviatilis</i>).....	73
6.4	Afrikai harcsa (<i>Clarias gariepinus</i>).....	75
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	76
8.	SUMMARY	78
9.	MELLÉKLETEK	80
M1.	Irodalomjegyzék	80
M2.	Oldatok összetétele	90
M3.	Mikroszatellit markerek kimutatásához alkalmazott PCR reakciók összetétele	92
M3.1	Süllő (<i>Sander lucioperca</i>).....	92
M3.2	Sügér (<i>Perca fluviatilis</i>).....	94
M3.3	Afrikai harcsa (<i>Clarias gariepinus</i>).....	96
M4.	Süllő (<i>Sander lucioperca</i>) mikroszatellit marker szettek multiplex PCR-alapú analízishez	99
M5.	Süllő (<i>Sander lucioperca</i>) multiplex PCR reakciókörülmények.....	100
M5.1	Süllő multiplex PCR reakciók összetételei	100
M5.1	Süllő multiplex PCR reakciók hőmérsékleti profilja	101
M6.	Süllő (<i>Sander lucioperca</i>) mikroszatellit markerek jellemzése	102
M6.1	Süllő mikroszatellit markerek általános jellemzése	102
M6.2	Populációgenetikai analízis során alkalmazott süllő mikroszatellit markerek jellemzése	104
M7.	Süllő (<i>Sander lucioperca</i>) populációgenetikai analízisben alkalmazott mikroszatellit markereinek jellemzése – null-allél jelenlétének valószínűsége, allél kiesés valószínűsége, valamint genotipizálási hibák valószínűsége alapján.....	108
M8.	Sügér (<i>Perca fluviatilis</i>) mikroszatellit markerek jellemzése	110
M8.1	Sügér mikroszatellit markerek általános jellemzése:	110
M8.2	Populációgenetikai analízis során alkalmazott sügér mikroszatellit markerek jellemzése:	111
M9.	Sügér (<i>Perca fluviatilis</i>) populációgenetikai analízisben alkalmazott mikroszatellit markereinek jellemzése – null-allél jelenlétének valószínűsége, allél kiesés valószínűsége, valamint genotipizálási hibák valószínűsége alapján.....	114
M10.	Afrikai harcsa (<i>Clarias gariepinus</i>) mikroszatellit markerek jellemzése	115
M10.1	Afrikai harcsa mikroszatellit markerek általános jellemzése:	115
M10.2	Afrikai harsa mikroszatellit markerek polimorfitásának jellemzése:	118
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	120

JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (amplifikált fragmentum hossz-polimorfizmus)
Ar	Allelic Richness (Allélgazdagság)
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (denaturáló gradiens gélelektroforézis)
dH ₂ O	desztillált víz
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	deoxiribonukleinsav
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezete)
F _{IS}	A genetikai variancia populáción belüli komponense
F _{ST}	A genetikai variancia populációk közötti komponense
H _E	várt heterozigotitás (expected heterozygosity)
H _O	megfigyelt heterozigotitás (observed heterozygosity)
HWE	Hardy-Weinberg egyensúlyi állapot (Hardy-Weinberg Equilibrium)
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LD	linkage disequilibrium (kiegyensúlyozatlan kapcsoltság)
MAHAL	Magyar Haltermelők és Halászati Vízterület-hasznosítók Szövetsége
MAS	marker assisted selection (markerre alapozott szelekció)
MASZ	Magyar Akvakultúra Szövetség
MQ-víz	molekuláris biológiai tisztaságú víz
Ne	Effektív populációméret
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbor Joining
P	szignifikancia szint
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
PCoA	Principal Coordinate Analysis (fő-koordináta elemzés)
PEG	polietilén-glikol
PIC	Polymorphic Information Content (Polimorf Információs Tartalom)
QTL	Quantitative Trait Loci (kvantitatív jelleget hordozó lókuszt)
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA (polimorf DNS véletlenszerű amplifikációja)

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (restrikciós fragment hossz-polimorfizmus)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (egyetlen nukleotid polimorfizmus)
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism (egyszálú konformáció polimorfizmus)
UPGMA	Unweighted Pair Group method using Arithmetic Averages (súlyozás nélküli pár csoport módszer számtani átlaggal)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

1. BEVEZETÉS

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

Célkitűzések

Munkánk során olyan ragadozó halfajok vizsgálatát tűztük ki célul, melyek Magyarországon is egyre jelentősebbek. Ezek közül az első a süllő (*Sander lucioperca*), mely hazánkban az egyik őshonos csúcsragadozó, igen keresett a sporthorgászok körében és a fogyasztók is igen kedvelik ízletes húsaért. Míg számos kutatócsoport foglalkozik a süllő produktum növelésével, addig a faj genetikai háttéréről hiányosak az információink, valamint kevés genetikai marker áll rendelkezésre az állományok mélyrehatóbb tanulmányozásához. Ezért célul tűztük ki fajspecifikus mikroszatellit markerek fejlesztését, valamint a fejlesztett genetikai markerekkel a Duna vízgyűjtő területéről származó állományok genetikai diverzitás vizsgálatát, annál is inkább, mivel a Közép-Európai süllő populációk variabilitását eddig még nem monitorozták.

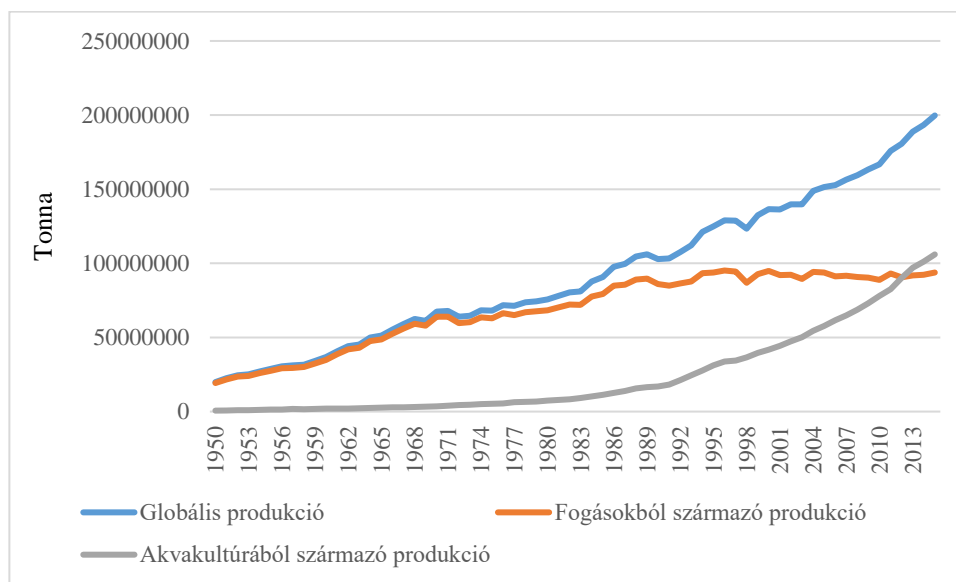
A süllővel egy családba (*Percidae*) sorolható sügér (*Perca fluviatilis*), szintén őshonos, egyre nagyobb népszerűségnek örvendő ragadozónk. Bár néhány fajspecifikus mikroszatellit már rendelkezésre áll a faj vizsgálatára, ez az eszköztár még nem elégséges a faj állományainak hatékony vizsgálatára.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

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

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Az akvakultúra növekvő jelentősége

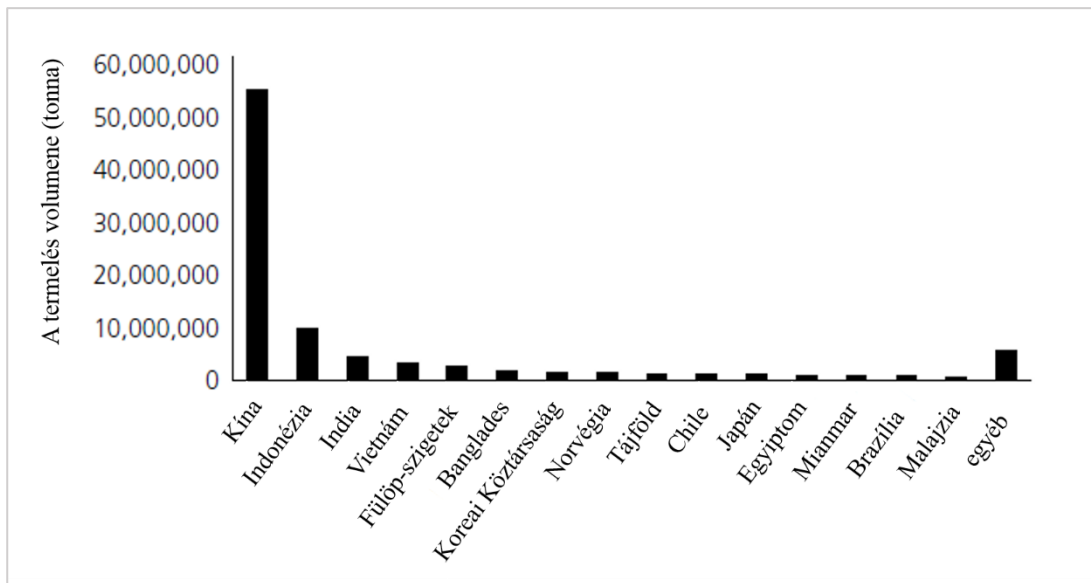
A globális édes- és tengervízi szervezetek (halak, rákok, puhatestűek, növények) termelése évről évre növekszik. Ez a produktum részben a természetes szaporulatból, részben az akvakultúra által előállított termékekből tevődik össze. A termelés adatait az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezete (FAO; Food and Agriculture Organization of the United Nations) 1950 óta regisztrálja (FAO 2017). A természetes szaporulatból származó mennyiséget a '90-es évekig egyre lassuló ütemű növekedése jellemzi (1. ábra), azonban azóta nincs számottevő növekedés, hanem igen jelentősek a fluktuációk, amik az erős emberi hatásokból fakadnak (élőhely degradáció, túlhalászat, környezetszennyezés). Az akvakultúra tengeri, valamint édesvízi állatok és növények kontrollált körülmények közötti termelését jelenti (Focardi et al. 2005). A '80-as évek óta az agrárágazat legnagyobb ütemben fejlődő szegmense az egész világon, a vízi eredetű élelmiszerek és termékek iránti növekvő igény kielégítése végett. Ez a megnövekedett igény többek között a megnövekedett népességnek is köszönhető, és az erősen fluktuáló fogásokból nem fedezhető (Naylor et al. 2000; Thornton 2010). Az igények nem csupán abban a tekintetben nőttek meg, hogy ezek az élelmiszerek elérhetőek legyenek, hanem abban a tekintetben is, hogy ezek a termékek kiváló minőségben, az év bármely időszakában könnyen beszerezhetőek legyenek. Az akvakultúrából származó termelés az elmúlt több mint 30 évben töretlenül gyarapszik, évi 8%-os növekedéssel (1. ábra).



1. ábra. Globális termelés 1950-2015 között (FAO adatai alapján). A produkció a fogásokból, valamint az akvakultúrában megtermelt mennyiségekből tevődik össze.

Engle és munkatársai (2017) szerint a természetes halászat nem csak a fogások fluktuációja (és azon keresztül a növekvő igények kielégíthetlensége) miatt problémás, hanem a kitermelés költsége is folyamatosan növekszik. Ezzel szemben az

akvakultúra relatív költsége a fejlesztéseknek és növekvő mértékének köszönhetően csökkenő tendenciát mutat (habár az akvakultúra jelenleg még mindig költségesebb a természetes szaporulat halászatához képest). Az akvakultúra tevékenységeit sokféleképpen csoportosíthatjuk, ezek közül az egyik, hogy megkülönböztetünk édesvízi és tengervízi akvakultúrát, melyek közül az édesvízi akvakultúra jelentősége a nagyobb, a tengeri szervezetek produktumának javarésze továbbra is a természetes fogásokból származik. Csoportosíthatjuk az alapján is, hogy mely kontinens vagy ország jár élen a termelés volumenét illetően: jelenleg Ázsia (azon belül is Kína) toronymagasan kiemelkedő mennyiséget állít elő ([Kobayashi et al. 2015](#)). Az európai országok közül Norvégia a legjelentősebb termelő (2. ábra).



2. ábra. Az akvakultúra termelésben kiemelkedő országok ([Engle és munkatársai nyomán, 2017](#)).

Az akvakultúra tevékenységi köre három csoportra bontható: az első az algatermesztés, a második a hal-, kagyló-, rák- és garnélatenyésztés, a harmadik pedig különféle vízi állatok tenyésztése a szabadon élő állományok gyarapítása céljából. Ezekből a tevékenységi körökből származó termékekkel próbálják azt a hiányt is pótolni, amit az egyre növekvő túlhalászat generál. Azonban az akvakultúrából származó produktum növekedéséhez elengedhetetlenek a folyamatos tartás- és tenyésztéstechnológiai fejlesztések. Ezek a fejlesztések igen sokrétűek, hiszen a termelésbe bevont faj részletes biológiai (optimális környezeti paraméterek, szaporodásbiológiai ismeretek, genetikai háttér, egyedfejlődési stádiumok, táplálkozás, biológiai sajátosságok stb.) ismeretén túl számtalan egyéb információ az, ami végül meghatározza az akvakultúrában betöltött szerepét. Ilyenek például hogy, hogyan javíthatjuk a tápanyag hasznosítást, vagy hogyan csökkentjük a felhasznált víz és energia mennyiségét, hogyan csökkentjük a környezetterhelést, hogyan kezeljük a keletkező szennyvizet, hogyan hasznosítsuk a keletkező melléktermékeket, hogyan javíthatnánk a termék minőségét (íz és tápérték tekintetében), hogyan bővíthetjük a már meglévő termékpalettát és a feldolgozás módját, miként diverzifikáljuk a

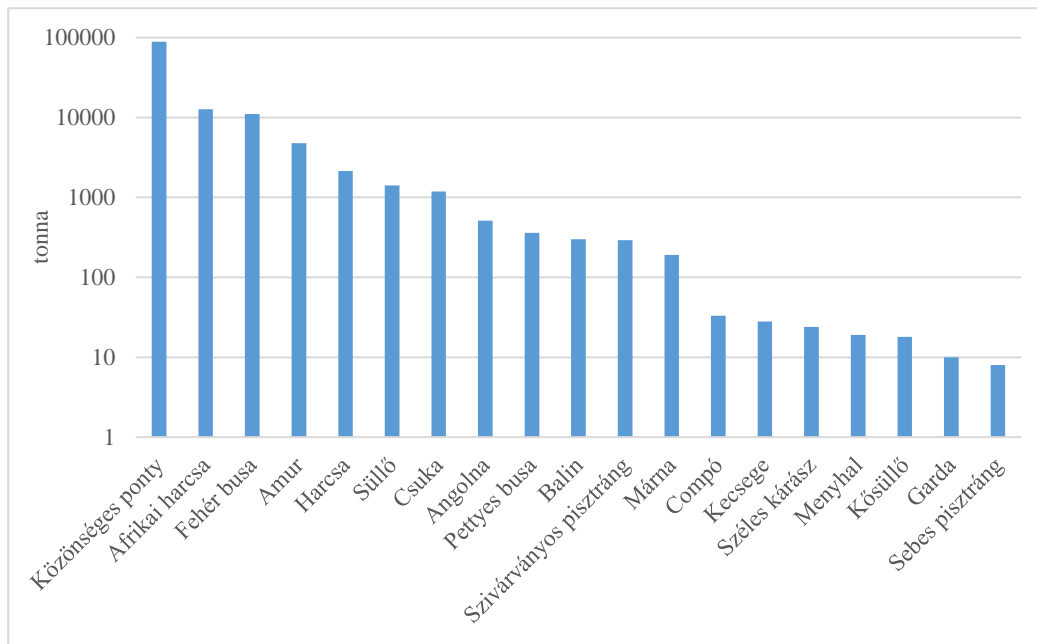
polikultúra fajösszetételét, mindezt úgy, hogy a termelés hosszútávon fenntartható legyen, azaz a természet adta erőforrásokat nem merítjük ki ([SustainAqua 2009](#); [Thornton 2010](#); [Wurts 2000](#)).

Számos faj esetén az akvakultúrát érintő fejlesztéseknek köszönhető a folyamatosan növekvő mennyiség és minőség, valamint az, hogy egész évben elérhető a termék. Az intenzív termelés minden fázisa kontrollált körülmények között zajlik, ebből fakadóan biztosítva van a nyomon követhetőség lehetősége, továbbá jobban érvényesíthetőek az élelmiszerbiztonsági előírások, mint például, hogy az akvakultúra terméknek mentesnek kell lenni peszticidektől és a génmódosítástól ([Frankic & Hershner 2003](#); [Focardi et al. 2005](#)).

Azonban további fejlesztések szükségesek - a produktum további növelése, betegségekkel szembeni nagyobb mértékű rezisztenciával rendelkező egyedek / vérvonalak kitenyésztése, újabb fajok bevonása stb. útján - amelyeket számos tudományterülethez kapcsolódó kutatás együttesen alakít. Ezek közé tartozik a molekuláris genetika és a populációgenetika is, mely tudományterületek többek között molekuláris markerek fejlesztésével és alkalmazásával járul hozzá a tenyésztési és tartástechnológiai fejlesztések kidolgozásához, valamint egyedek / állományok genetikai jellemzéséhez ([Liu & Cordes 2004](#)).

Az akvakultúra helyzete Magyarországon

Magyarországon a legnagyobb mennyiségben előállított hal töretlenül a ponty (*Cyprinus carpio*) ([MAHAL 2016](#)), magasan kiemelkedik minden más termelt halfajunkhoz képest is (A FishStat adatai szerint 2015-ben 18 ezer tonnát állítottak elő Magyarországon pontyból, a második helyen álló afrikai harcsából pedig 2840 tonnát, *3. ábra*) ([FAO 2017](#)).



3. ábra. Magyarország jelentősebb halfajainak termelése 2010-2015 között (FAO adatai alapján 2017).

A magyarországi akvakultúra a '80-as évekig kimagaslónak számított a klasszikus édesvízi tógazdasági haltenyésztésnek köszönhetően (MASZ 2015). Az azóta végbement fejlesztések következtében számos ország haltenyésztése túlszárnyalta Magyarországot. Jelenleg számos újításra fordítanak jelentős anyagi támogatásokat Magyarország versenyképességének fokozásáért, valamint több csapásirányban vannak kezdeményezések, amelyekkel a ponty mellett más, kedvelt fajok mennyiségét kívánják növelni (Vidékfejlesztési Minisztérium 2013). Ilyen kedvelt fajok a jelen tanulmány tárgyát is képező ragadozó halak: az afrikai harcsa, a süllő és a sügér. A 3 faj közül az afrikai harcsa-produkció jelenleg is kiemelkedően magas, köszönhetően számos előnyös biológiai jellemzőinek, amelyek lehetővé tették, hogy recirkulációs rendszerben előállítsák elő. A süllő és a sügér érzékenyebb, ami megnehezíti az üzemi szintű tenyésztésüket. Az akvakultúrában megtermelt halaknak nem csupán az élelmiszer előállításban van szerepük, hanem az antropogén hatások (túlhalászat, élőhely degradáció, környezetszennyezés) okozta leromlott természetes diverzitást is ellensúlyozhatja, továbbá segíthet abban is, hogy veszélyeztetett fajokat szaporíthassunk és tarthassunk fent (Naylor et al. 2000; SustainAqua 2009). Ezeknek a céloknak az eléréséhez – mint például a technológiai fejlesztés, a diverzitás és a produktum növelése – a molekuláris biológia igen fontos szerepet tölt be (Park & Moran 1995).

2.2 Genetikai markerek alkalmazása az akvakultúrában

Az akvakultúra fejlesztései közepette nem feledkezhetünk meg arról a szemponttól sem, hogy ezeket a fejlesztéseket a genetikai diverzitás megőrzésére törekedve végezzük el, mivel csupán a kellően magas genetikai diverzitással rendelkező populáció képes a környezet megváltozásaihoz sikeresen alkalmazkodni (Liu & Cordes

2004). Ezt a diverzitást a genetikai variációk összessége alkotja. Az egyes genetikai variációk mutációk - bázis szubsztitúció, inszerció, delécio vagy lókuszt átrendeződés - révén jöhetnek létre, a biológiai tulajdonságok és környezeti paraméterek együttesen alakítják (Sunnucks 2000). A nagyobb mértékű genetikai változásokat már elektroforézissel vagy restriktív emésztéssel is diagnosztizálni tudjuk, de a legkisebb mértékű változásokat szekvenálással, továbbá SNP analízissel detektálhatjuk. Azonban a szekvenálás magas költsége miatt a genetikai diverzitás mértékét genetikai markerekkel is monitorozhatjuk (O'Connell & Wright 1997). Minden olyan jelleget – pl. nukleinsav szekvencia, fehérjemolekula – amely jelöl vagy nyomon követ egy részt / lókuszt a kromoszómán, genetikai markerként használhatunk (Okumus & Ciftci 2003). A kutatók a genetikai variációk feltérképezésében kezdetben fenotípusos bélyegeket, viselkedési mintázatokat és migrációs mintázatokat alkalmaztak (O'Connell & Wright 1997). Az 1960-80-as években a vérből izolálható fehérjék (Moller 1970), majd később különböző enzimek (alloenzimek) elektroforézise alapján becsülték a diverzitást (géntermék vizsgálat), a '90-es évektől - PCR technika elterjedését követően - pedig számos DNS-alapú technikát (DNS-szintű vizsgálat) fejlesztettek (Okumus & Ciftci 2003). Az ideális genetikai markerrel szemben megfogalmazható néhány kritérium: lehetőség szerint DNS alapú legyen, a kromoszómák mentén egyenletesen megtalálható legyen, alkalmazható legyen a PCR módszer, az analízis megismételhető legyen (így mások eredményeivel is összevethetőek a saját eredményeink), a genom több pontját lehessen vizsgálni, a markert könnyen / olcsón / gyorsan lehessen fejleszteni, valamint a marker kellően polimorf legyen, egy-lókuszos és automatizálható legyen a kiértékelés, valamint kodomináns öröklődésű legyen (Sunnucks 2000). Mivel olyan marker nincs, ami minden kritériumnak maximálisan megfelel, ezért a vizsgálat tárgya és célja határozza meg, melyik marker típus a legalkalmasabb a vizsgálat elvégzésére. A marker választás legalapvetőbb szempontjai a következők: a vizsgálat célja, a vizsgált minta minősége és mennyisége, a módszer felbontóképessége, vannak-e elérhető markerek, amennyiben nem, úgy a markerfejlesztésnek mekkora az idő- és munkaigénye, valamint a módszer költségigénye (Okumus & Ciftci 2003). A genetikai markerek felhasználási területe igen tág (Jarne & Lagoda 1996): genetikai eredetű betegségek diagnosztikájában (Apablaza et al. 2015), géntérképezésben (Tong & Chu 2002; Liu 2003; Yue 2014; Tong & Sun 2015), populációgenetikai vizsgálatokban – variancia, valamint a beltenyésztettség meghatározására (Davis & Hetzel 2000), rokonsági kapcsolatok feltárásában (Queller et al. 1993), állományok / populációk genetikai megkülönböztetésére (Björklund et al. 2007), a házasítás / tenyésztés hatásának nyomon követésére (Horváth et al. 2014), a tenyésztő a saját termékének genetikai jelölésére (Rolli et al. 2014), a tenyésztés szempontjából fontos, valamint a kvantitatív jelleget hordozó lókusztok térképezésében (QTL mapping) (Kennedy et al. 1992; Beuzen et al. 2000), markerre alapozott szelekcióban (MAS) (Yue 2014), a genom manipulációk igazolásában

(ploiditás, ginogenezis, androgenezis, ivar meghatározás, ivarátfordítás igazolásában) ([Carter et al. 1991](#)). A molekuláris markereket jellemző szám a PIC (Polymorphic Information Content), amely megmutatja, hogy az adott marker mennyire alkalmas polimorfizmus vizsgálatára. Értéke függ a detektált allélok számától és azok frekvencia megoszlásától: minél magasabb az allélszám, valamint minél egyenletesebb az allél frekvenciák eloszlása, annál magasabb a PIC értéke, így annál alkalmasabb polimorfizmus vizsgálatokban. Botstein és munkatársai az alábbi ajánlást teszik a PIC értékére vonatkozóan: Azok a markerek, melyek PIC értéke meghaladja a 0,5-t a rendkívül (nagyon) informatív csoportba sorolja. Azok, amelyek értéke 0,5 és 0,2 közötti a mérsékelten informatív markerek, és amelyek értéke 0,2-nél kisebbek, azok a csekély mértékben informatívak. Ennek megfelelően, markerek kiválasztása esetén a legoptimálisabb az, ha csak olyan markereket alkalmazunk, melyek PIC értéke meghaladja a 0,5 értéket. ([Botstein et al. 1980](#)).

A legjelentősebb – akvakultúrában széleskörűen alkalmazott - genetikai markerek a következők, összehasonlító jellemzésüket az *1. táblázat* tartalmazza:

- **Alloenzimek**

A DNS-ben történő változás a fehérjékben 1-1 aminosav cseréjét eredményezheti, ami a vizsgált enzim méret- és töltésbeli megváltozásában mutatkozik meg. Az így létrejövő fehérjeszintű különbségek elektroforézissel kimutathatóak. Ezt a módszert már a '60-as évek óta használták, de az akvakultúrában csupán a '80-as évektől vált elterjedté ([Hunter & Markert 1957](#); [Liu & Cordes 2004](#)). Az akvakultúrában populációk / állományok azonosítására, fajok és magasabb taxonómiai csoportok elkülönítésére, valamint származás ellenőrzésre és kifelbontású genetikai térképek megalkotására alkalmazták ([O'Connel et al. 1996](#)). Kis költségű, könnyen kivitelezhető, kodomináns öröklődés menetét követő genetikai markerek, amelyekkel egyszerre több lókuszt is vizsgálható. Hátránya, hogy csak „frissen” és nagyobb mennyiségben vett mintából lehet eredményesen dolgozni, valamint a null-allél lehetősége, továbbá, hogy nem teljes mértékben tükrözi a DNS megváltozását (ezzel a módszerrel például nem mutathatóak ki azoknak a DNS szakaszoknak a megváltozása, amelyről nem történik fehérjeszintézis, vagy amely változás nem eredményez aminosav cserét) ([Okumus & Ciftci 2003](#)). Sok tanulmányban az alloenzimeket valamilyen más marker vagy jelleg vizsgálatával együttesen alkalmazzák, hátrányos tulajdonságainak ellensúlyozása végett, mint ahogyan Grobler és munkatársai munkájában is láthatjuk. Grobler és munkatársai ([1994](#)) afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) állományokat vizsgáltak alloenzimekkel, melyben a morfológiai és genetikai jellegek kapcsolatát vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a heterozigotizáció és a fenotípusos variancia korrelálnak.

- **Mitokondriális DNS markerek**

A sejt citoplazmájában elhelyezkedő mitokondriumok saját örökítő anyaga – a mitokondriális DNS – néhány tulajdonságában jelentősen eltér a sejtmagi DNS-től ([Brown et al. 1979](#); [Okumus & Ciftci 2003](#); [O'Connell et al. 1995](#)), bizonyos vizsgálatokra különösen alkalmas (például faj azonosításra, hibridizáció igazolására, palacknyak effektus meghatározására), ahogyan ezt Béres és munkatársai ([2017](#)) tanulmányában láthatjuk, amelyben fajspecifikus mitokondriális markereket írtak le törpeharcsa hibrid és a szülői fajok megkülönböztetésére. A mitokondriumok a sejtben sok - akár több tíz ezer - kópiában is megtalálhatóak, könnyen izolálhatóak. A haploid mitokondriális genom anyai öröklődés menetét követi, a mutációs rátája 10-szer nagyobb a genomi DNS-hez képest ([Birky et al. 1989](#)). Leggyakrabban a D-loop régiót vizsgálják: ez a mitokondriális DNS nem-kódoló régiója (azaz nem történik fehérjeszintézis erről a régióról), amely nincs szelekciós nyomás alatt, igen hipervariábilis, ezért diverzitás vizsgálatra alkalmas ([Bernatchez et al. 1992](#)). A mitokondriális DNS citokrom b gén vizsgálatával filogenetikai analíziseket végeznek univerzális és konzervatív jellegüknek köszönhetően ([Johns & Avise 1998](#)). A mitokondriális genom vizsgálatának legnagyobb hátránya, hogy nem tükrözi a sejtmagi genom változásait, ezért önmagában nem alkalmazható diverzitás becslésre ([Liu & Cordes 2004](#)).

- **Restrikciós fragment hossz-polimorfizmus (RFLP)**

Az RFLP módszer az első sejtmagi genom vizsgálat, ami új területet nyitott a biológiai tudományok számára. Az RFLP technika ([Botstein et al. 1980](#)) molekuláris háttere az, hogy a restrikciós enzimek felismerő helyeiben végbemenő mutációs esemény (szubsztitúció, inszerció, delécio) megváltoztatja a hasítás következtében keletkező DNS szakaszok méretét és számát, azaz ha eltűnik egy hasítóhely, akkor megnő a fragment mérete és ezzel csökken a fragmentek száma. Kivitelezése egyszerűsödött a PCR módszer elterjedésével, ugyanis a PCR lehetővé tette, hogy felsokszorozzuk azt a DNS-szakaszt, ami a restrikciós helyet hordozza, ezzel az analízis kiértékelése is könnyebbé vált (PCR-RFLP). Bár előnyös, hogy kodomináns öröklődést mutat, azonban nem túl magas polimorfítása miatt diverzitás becslésre kevésbé alkalmas ([Liu & Cordes 2004](#)). Lehoczky és munkatársai ([2005](#)) úgy tudták mégis diverzitásbecslésre alkalmazni a PCR-RFLP markereket, hogy mikroszatellit markereket is alkalmazott közönséges ponty (*Cyprinus carpio L.*) tiszai és dunai vérvonalak vizsgálata során.

- **Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)**

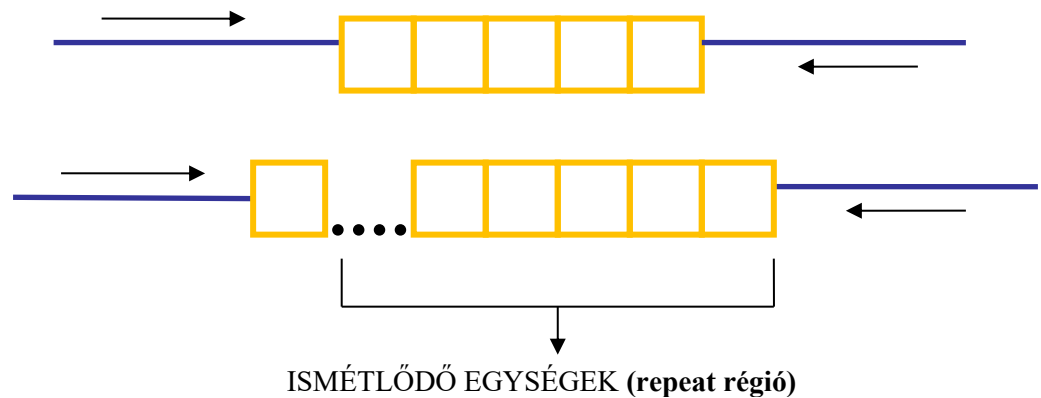
A RAPD markerek alléljainak kimutatása PCR-rel történik, amelynél rövid (8-10 bp) hosszúságú primereket alkalmaznak alacsony annealing (primer kapcsolódási) hőmérséklet mellett ([Williams et al. 1990](#)). Ezekről az oligonukleotidokról a láncszintézis a genom több pontjáról indul egyszerre. A reakció során számos különböző méretű fragment keletkezik, azaz a módszer során egyszerre több lókuszt vizsgálható a szekvencia ismerete nélkül. Az ampliconok megléte/hiánya, valamint mérete és száma tükrözi a divergenciát. Előnyös tulajdonságai közé tartozik, hogy egyszerű és gyors a kimutatásuk, amihez kis mennyiségű DNS is elegendő, nagy polimorfitásúak, azonban a sok fragment kiértékelése nehézkes, valamint a reakció igen laborérzékeny (ami miatt problémás a reprodukálhatósága) ([Pérez et al. 1998](#)). A domináns/recesszív öröklődés miatt a homozigóta domináns és a heterozigóta genotípusok nem különböztethetőek meg ([Wirgin & Waldman 1994](#)). A fent leírt kedvező tulajdonságoknak, valamint a könnyű és olcsó kivitelezésnek köszönhetően számos tanulmányban kedvelt módszer: fajok azonosításában, populáció szerkezetének vizsgálatában, környezeti hatások tanulmányozásában, diverzitás becslésben ([Liu & Cordes 2004](#)). Kovács és munkatársai ([2001](#)) ivar specifikus RAPD markereket hoztak létre *Clarias gariepinus* fajból, amely nem csupán a fajon belül alkalmazható, hanem közel-rokon fajokban is működőképesek (*Clarias macrocephalus*, *Heterobranchus longifilis*). Müller és munkatársai ([2004](#)) RAPD markereket használtak a süllő és a kősüllő fajok és azok hibridjének, a fehérkővesnek az elkülönítésére.

- **Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

Az AFLP technika az RFLP kis polimorfitásait és a RAPD módszer alacsony reprodukálhatóságát célozta kiküszöbölni. Ebben a módszerben a restrikciós hasítást 2 enzimrel végezzük: egy gyakran és egy ritkán hasítóval. A keletkező (és különböző végű) fragmentek végére ismert szekvenciájú adaptereket kapcsolunk. Ezt követően PCR reakcióban felszorzozzuk a fragmenteket: a pre-szelekciós lépésben 1 nukleotiddal túlnyúló primert alkalmazunk, a poszt-szelekciós PCR reakció során már 2 vagy 3 nukleotiddal túlnyúló oligonukleotidokat alkalmazunk, valamilyen jelölés (pl. fluoreszcens festék) beépítésével egyidejűleg. Az ampliconokat elektroforézissel detektáljuk. Ezzel a módszerrel a restrikciós fragmentumok meglétét vagy hiányát tudjuk jelezni és erre a módszerre is igaz, hogy egyidejűleg több lókuszt vizsgálható ([Vos et al. 1995](#)). További előnye, hogy nagy polimorfitást mutat, könnyen reprodukálható, olcsó, hátránya a domináns/recesszív öröklődés miatt valamint a bonyolult mintázat kiértékelése ([Liu & Cordes 2004](#)).

- **Mikroszatellitek**

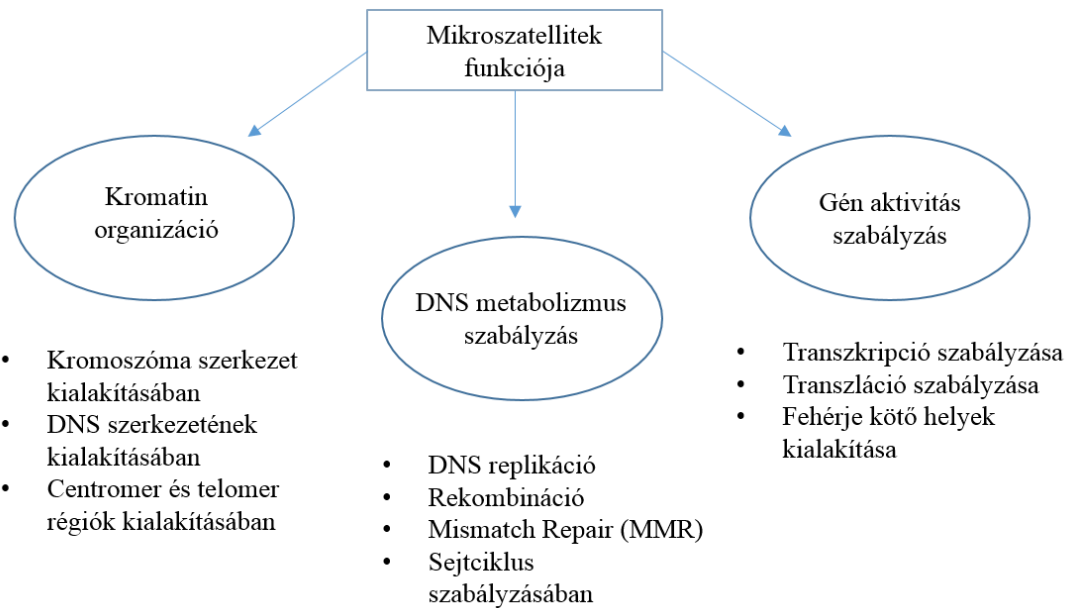
Mivel jelen tanulmány a mikroszatellitek izolálásáról és populációgenetikai alkalmazásáról szól, ezért ezt a genetikai markert nagyobb részletességgel mutatom be. A mikroszatellitek a repetitív szekvenciák csoportjába sorolható olyan 1-6 bázispárnyi ismétlődések sorozatai, amelyek két, csak az adott genom egyetlen pontjára jellemző szekvencia-részlet között helyezkednek el. A polimorfizmusukat az ismétlődések számának változása adja (4. ábra). (Tautz 1989; Weber & May 1989; Litt & Luty 1989). Kimutatásukat a határoló szekvenciákra tervezett PCR primerek teszik lehetővé (Bruford & Wayne 1993).



4. ábra. A mikroszatellitek vázlatos felépítése. A négyzetek az ismétlődő egységeket, a fekete nyilak a specifikus primereket, a kék vonalak az egyedi határoló - **flanking** - szekvencia részeket jelölik.

A mikroszatellitek mind a prokarióta, mind az eukarióta szervezetekre jellemzőek (Tautz et al. 1986). Az állatvilág – így a halakra is - legjellemzőbb ismétlődő egységei a citozin-adenin (CA) és a guanin-adenin (GA) dinukleotid egységek (Tóth et al. 2000). A mikroszatellitek jelentősége az 1980-as évektől kezdődően növekedett egészen az újgenerációs szekvenálási technológiák elterjedéséig, ugyanis sokkal informatívabb genetikai marker a fent felsoroltaknál, azonban kevésbé informatív a DNS szekvenciához képest (Hughes & Queller 1993; Jarne & Lagoda 1996; Pérez-Espona 2017; Yue & Wang 2017). Előnyös tulajdonságai között szerepel, hogy kodomináns öröklésmentű, szelekciós szempontból neutrális, az egész genomban megtalálhatóak (átlagosan 10 kbp-onként), a könnyebben értékelhető egy-lókuszos analízist teszi lehetővé, polimorfítása kiemelkedően magas, kis allélméretüknek köszönhetően egyszerű a kimutatásuk PCR reakcióval és az azt követő kapilláris elektroforézissel (Queller et al. 1993; Jarne & Lagoda 1996; Magoulas 1998). A genomban mind a kódoló, mind a nem-kódoló régiókban megtalálhatóak, a nem-kódoló régiókban nagyobb mennyiségben fordulnak elő (Kashi et al. 1997; Metzgar et al. 2000; Tóth et al. 2000). Mutációs rátája $10^{-2} - 10^{-6}$ / lókusz / generáció, melyet a hosszukban bekövetkező változás tükröz (Amos & Rubinsztein 1996; Ellegren 2000). A mikroszatellitek érintő mutációs

események leggyakrabban a repeat régióon belül történnek a replikáció során a polimeráz enzim megcsúszása (slippage) révén ([Schlötterer & Tautz 1992](#)), valamint bekövetkezhet egyenlőtlen rekombináció és téves bázisbeépülés következtében, vagy transzponozoknak köszönhetően ([Levinson & Gutman 1987](#); [Charlesworth et al. 1994](#); [Beuzen et al. 2000](#); [Ellegren 2002](#); [Sekar et al. 2009](#)). Mint a többi genetikai markernek, a mikroszatelliteknek is vannak korlátai: a slippage jelensége a kimutatásukhoz alkalmazott PCR reakcióban is megfigyelhető, emiatt hibás genotipizálás is lehetséges, módosítja a végeredményt a null-allélok jelenléte, ami többek között abból fakadhat, hogy egy mutáció éppen a primer kötőhelyet érintette ([Bruford & Wayne 1993](#)), vagy hogy a hossz-polimorfizmust nem a repeat egység mutációja, hanem a flanking régióon belüli mutáció okozza ([Callen et al. 1993](#)). Hátránya még a markerfejlesztés magas költség-, idő- és munkaiigénye ([O'Connell & Wright 1997](#); [Magoulas 1998](#); [Vignal et al. 2002](#)). A mikroszatellitek DNS-ben betöltött szerepéről igen sokrétű, ám kevésbé bizonyított feltételezés van. Néhány esetben bizonyították, hogy kromatin organizációban, DNS rekombináció, valamint a transzkripció szabályozásában, továbbá a génexpresszió és a sejtciklus módosításában vesznek részt ([Li et al. 2002](#); [Chistiakov et al. 2006](#)) (5. ábra), azonban ezek egyike sem tekinthető általánosnak. Mindezeket a mikroszatellitek az ismétlődő egységének szekvenciájából eredő sajátos szerkezet (pl. hurok) kialakítása révén végzi. A mikroszatellitek felhasználhatóak géntérképezésre, ([Knapik et al. 1998](#)) egyedi DNS azonosításra és származás ellenőrzésre ([Vandeputte et al. 2011](#)), filogenetikai és konzerváció genetikai tanulmányokban ([Zardoya et al. 1996](#)), molekuláris járvány- és kórtanban ([Rodríguez-Ramilo et al. 2011](#)), mennyiségi jellegek (QTL) térképezésében ([Beuzen et al. 2000](#); [Cnaani et al. 2003](#)) és markerre alapozott szelekcióban (MAS) ([Poompuang & Hallerman 1997](#)), vérvonalak elkülönítésében ([Horváth et al. 2014](#)), valamint egyes populációk és állományok diverzitásának a meghatározásában ([Slatkin 1995](#)).



5. ábra. A mikroszatellitek funkciói ([Li és munkatársai nyomán 2002](#))

• **Single Nucleotid Polymorphism (SNP)**

Az SNP-marker egyetlen bázis megváltozásával (szubsztitúció révén) jön létre ([Chee et al. 1996](#)). A genomban igen sok SNP van, a kódoló régió SNP markerei a fehérje aminosav sorrendjét – és ezen keresztül a funkcióját – is megváltoztathatja. Mivel ennél a markernél nem jellemző a polimeráz megcsúszása - a replikáció vagy transzláció esetén – sokkal stabilabban öröklődnek. Kodomináns biállélos marker, aminek köszönhetően az eredmények könnyen értékelhetőek, a kiértékelés automatizálható. A kétállélos tulajdonság hátránya, hogy sokkal több markerre van szükség, hogy megbízható eredményeket kapjunk. Beuzen és munkatársai (2000) szerint ötször annyi SNP szükséges, mint mikroszatellit, Vignal és munkatársai (2002) háromszoros mennyiségű SNP-marker alkalmazását javasolják a mikroszatellitekhez képest. Kimutatására több lehetőség is van: restriktions hasítás alapján (PCR-RFLP technikával), vagy az SNP markert tartalmazó DNS-szakasz konformációs vizsgálata alapján (pl. SSCP, DGGE), szekvencia meghatározással, vagy éppen oligonukleotid próba segítségével. Az oligonukleotid próbák révén a chip technológiának köszönhetően ([Lipshutz et al. 1999](#)) az SNP analízisnek igen nagy lett a felbontóképessége, valamint automatizálható és gyors módszerré vált ([Liu & Cordes 2004](#)). Az újgenerációs szekvenálási módszerek elterjedésével jelenleg a legkedveltebb molekuláris genetikai marker ([Yue & Wang, 2017](#)).

1. táblázat. A genetikai markerek jelentősebb jellemzőinek összehasonlítása ([Liu & Cordes nyomán 2004](#)).

Marker típus	Jellege	Öröklődése	Kódoló szakasz (K) / Nem-kódoló (NK) szakasz vizsgálatára alkalmas	Egy lókuszt (E) / Több lókuszt (T) egyidejű vizsgálatára alkalmas	Várható allélszám	A polimorfitás mértéke
Alloenzim	biokémiai	kodomináns	K	E	2--6	alacsony
Mitokondriális DNS	sejtorganellumi	anyai	--	--	sok	változó
RFLP	sejtmagi	kodomináns	K és NK egyaránt	T/E	2	alacsony
RAPD	sejtmagi	domináns / recesszív	főleg NK	T	2	közepes
AFLP	sejtmagi	domináns / recesszív	főleg NK	T	2	magas
Mikroszatellit	sejtmagi / mitokondrium	kodomináns	főleg NK	E	sok	magas
SNP	sejtmagi	kodomináns	K és NK egyaránt	E	2 (de legfeljebb 4)	magas

2.3 Mikroszatellit izolálási módszerek

A mikroszatellitek felépítésről a korábbi fejezetben már szó esett, ezért csupán visszaalakok arra, hogy a mikroszatellitek flanking régiói igen konzervatívak, továbbá rendszerint faj, de legalább taxon specifikusak. Ezért ezeket a markereket szükséges a vizsgált fajból fejleszteni, vagy közel rokon fajból izolált markereket adaptálni. Mivel az adaptációnak jelentős korlátai vannak ([Yue et al. 2010](#)), valamint kevés esetben igaz, hogy közel rokon fajból vannak már leírt markerek (mert kimagaslóan sok marker „csupán” a gazdaságilag vagy kutatási szempontból jelentős fajokból állnak rendelkezésre), így a legtöbb esetben (új fajok esetén) szükséges az izolálás, ami tulajdonképpen annak a DNS-szakasz bázissorrend meghatározását jelenti, amely a mikrosatellit hordozza. A mikroszatellitek izolálási módszere igen nagy változáson és fejlődésen ment keresztül ez elmúlt évtizedekben. A molekuláris biológia forradalmi átalakulása és korszerűsödése ezen genetikai markerek fejlesztési módozataiban is nyomon követhető. Kezdetben a kutatók könyvtárkészítés nélkül izoláltak markereket, a RAPD módszer segítségével ([Wu et al. 1994](#)). Ezt kétféleképpen alkalmazták: vagy a RAPD primer tartalmazta a mikrosatellite jellemező ismétlődő egységeket, vagy a RAPD analízist követően hibridizáltatták a fragmenteket ismert szekvenciájú, mikrosatellitekre jellemző ismétlődéseket hordozó próbákkal ([Cifarelli et al. 1995](#)). Bár ehhez a módszerhez nem szükségesek előzetes szekvencia információk (továbbá gyors és olcsó, valamint relatíve egyszerű a kivitelezése és az eszközigénye), a módszer hatékonysága még meglehetősen alacsony volt, valamint csupán a nehezebben értékelhető multi-lókuszos analízisre teremtett lehetőséget. Ennél jóval hatékonyabbak a parciális könyvtár készítésen és - szűrésen alapuló módszerek. Az izolált DNS-t restriktív enzimekkel hasították (vagy ritkább esetben szonikálással). A 300-700 bp méretű fragmenteket vektorba klónozták (ezt megelőzheti egy ismert szekvenciájú adapter hozzáépítése a DNS két végére). A transzformációt a telepek szűrése követte, amit kezdetben egy olyan Southern-hibridizációval végeztek, amelyben az oligonukleotid próba mikrosatellitekre jellemző ismétlődéseket tartalmazott. Ez a hibridizációs próba a detektáláshoz szükséges jelölést is hordozta, ami lehetett radioaktív (^{32}P ; ^{33}P) vagy nem-radioaktív (pl. digoxigenin) ([reviewed in Zane et al. 2002](#)). Ez a módszer már sokkal költség-, idő- és munkaigényesebb a korábnál, azonban sokkal hatékonyabb is. A módszert továbbfejlesztették, abból a célból, hogy a munka és idő ráfordítást csökkentsék. Ezt úgy érték el, hogy egy dúsítási eljárást alkalmaztak a fent leírt könyvtárkészítés során. Ezt a dúsítást Paetkau és munkatársai ([1999](#)), valamint Ostrander és munkatársai ([1992](#)) ún. horgonyzott primerek alkalmazásával végezték: az alkalmazott primer repeat-specifikus szekvenciát, valamint az 5' végen biotin jelölést hordozott, majd a detektálást Southern-hibridizációval végezték. Ezekkel a módszerekkel még ugyan nem egyszerűsödött a könyvtárkészítés, azonban a könyvtárak szűrésére fordított idő

markánsan lerövidült. A jelenleg is alkalmazott és leginkább kedvelt izolálási módszereket alább részletezzük Andrés & Bogdanowicz alapján ([2011](#)).

2.3.1 Tradicionális izolálás

A jelenleg is alkalmazott szelektív hibridizáción alapuló izolálási módszer alapjait Hamilton és munkatársai ([1999](#)) fektették le. A genomi DNS-t restriktációs enzimekkel hasítják, majd a megfelelő méretű fragmentek (rendszerint 300-1000 bp) visszaizolálását követően a DNS-szakaszok végére duplaszálú ismert szekvenciájú adaptereket ligálnak. Ezt követi a dúsítás, ami többféleképpen is kivitelezhető: Kandpal és munkatársai ([1994](#)), valamint Kijas és munkatársai ([1994](#)) 5'végen biotinilált repeat-egységeket tartalmazó próbákkal végezte a dúsítást (folyékony közegben), míg Karagoyozov és munkatársai ([1993](#)), valamint Armour és munkatársai ([1994](#)) nylon membránra kötötte a próbákat (szilárd fázison). Ezek közül jelenleg a leggyakoribb az 5'végen biotinilált próba alkalmazása. Ez a próba a mikroszatellit hordozó DNS-szakasszal hibridizál, majd sztreptavidinnel borított mágnesezhető gyönggyel képez komplex vegyületet. A leoldott egyszálú DNS-t az adatterről induló PCR reakcióval kétszálúsítják, majd a megfelelő klónozó vektorba ligálják. A vektorkonstrukciót kompetens sejtbe transzformálják, majd szelektív táptalajon növesztik a sejteket. A felszaporodó telepeket PCR reakció segítségével szűrik. Így végeredményképpen főleg azok a fragmentek kerülnek szekvencia meghatározásra, amelyek ismétlődő egységeket hordoznak ([Zane et al. 2002](#)).

2.3.2 Új generációs szekvenálási módszeren alapuló izolálás

Az új-generációs szekvenálási módszerek merőben eltérnek a klasszikus Sanger-féle szekvencia meghatározástól. A módszerek fejlesztésénél alapvető szempont volt, hogy csökkentsék a teljes genomok szekvenálásának költségeit. Ezt úgy tudták elérni, hogy sok mintának egyidejűleg határozzák meg a bázissorrendjét, ezzel csökkentve az időráfordítást, valamint csökkent az egyetlen nukleotid meghatározásának a költsége is ([Abdelkrim et al. 2009](#)). Ezeknél a módszereknél némileg csökkent a leolvasott szakaszok hossza (néhány száz bázispár), azonban a leolvasott fragmentek száma igen megnövekedett. Rendelkezésre állnak olyan bioinformatikai rendszerek, amelyek ezeknek a leolvasott szakaszoknak az összeillesztését végzi, valamint olyan szoftverek, amelyek lehetővé teszik az összeillesztésből nyert hatalmas adathalmazokon belüli keresést és eligazodást. A módszer előnyös abból a szempontból is, hogy relatíve könnyedén és gyorsan kivitelezhető a teljes genom szintű vizsgálat, azonban a módszernek vannak korlátai is, mint például, hogy az egy nukleotid szekvencia meghatározás költsége ugyan csökkent, azonban a végeredményként kapott hatalmas adatmennyiség okán az összköltség továbbra is igen magas, valamint a kapott fragmentek leolvasási hosszai (read) megrövidültek. Az összeillesztésben is adódhatnak hibák (pl. ha csupán a repetitív DNS-szakaszban van

átfedés), ami így konkatamer szekvenciákat eredményez. További nehézséget jelent, hogy az új-generációs szekvenáláshoz kapcsolódó szoftvereknek nagy teljesítményű számítógépekre van szükségük ([Andrés & Bogdanowicz 2011](#)). A tradicionális markerfejlesztéshez képest viszont jóval kevesebb laboratóriumi munkára van szükség, ami szintén fontos szempont. Bár új-generációs szekvenálási módszerek a mikroszatellitek izolálásában kevésbé terjedtek el az SNP markerekhez képest, King és munkatársai ([2015](#)) tanulmányában olvashatunk erre példát, ahol *Illumina*, illetve az *Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) sequencing platform* segítségével fejlesztettek mikroszatelliteket.

2.4 Genetikai markerek alkalmazása a populációk diverzitásának becslésében

A populációk vagy állományok jellemzésekor legelőször az allélok / genotípusok / gének frekvenciáját, majd a heterozigotitást szükséges meghatározni. A megfigyelt heterozigotitás rendszerint eltér a várt heterozigotitástól, bár a különbség nem feltétlenül szignifikáns. Ebben az esetben a Hardy-Weinberg egyensúly fennállásáról beszélünk. Az egyensúlyban lévő populációra jellemző a nagy egyedszám, a random párosodás, a populációt nem éri szelekciós nyomás, nem történik mutáció és nincs migráció, valamint az allél és genotípus gyakoriságok generációnként állandóak. A vizsgált populációt ehhez az idealizált állapothoz viszonyítjuk, az ettől való eltérés tükrözi a szelekció jelenlétét, a migráció fennállását és a nem random párosodást ([Wright 1949](#)). Az eltérés χ^2 -próbával, valamint Exact teszttel mérhető. Az eltérés szignifikanciájának meghatározásához valószínűség vizsgálat szükséges (Probability Test) ([Guo & Thompson 1992](#)). A populációk közötti és populáción belüli genetikai különbözőség F -statisztikával határozható meg, ahol F_{IT} a teljes genetikai variációt jellemző komponens, F_{ST} a populációk közötti genetikai variációt jellemző komponens, F_{IS} a populáción belüli genetikai variációt jellemző komponens ([Weir & Cockerham 1984](#)). A populációk genetikai analízise során a kiegyensúlyozatlan kapcsoltság (linkage disequilibrium, LD) fennállása és mértéke is vizsgálandó, valamint ezek az értékek a géntérképezésben is felhasználhatóak. Ebben a lépésben a véletlen kombinálódástól való eltérést vizsgáljuk, ami leginkább ott mutatható ki, ahol a gének kapcsolatosak, de egyes szelekciós hatásokra ott is bekövetkezhet, ahol a gének fizikailag nem kapcsolatosak. Az ideális populációban $LD=0$, amiben tehát fennáll a véletlen kombinálódás lehetősége, de ha egy populációban LD szignifikánsan eltér 0-tól, akkor valamilyen szelekciós erő (vagy éppen a fizikai kapcsoltság) fenntartja a kapcsoltságot ([Lewontin & Kojima 1960](#); [Ciftci & Okumus 2002](#)). A genetikai variációt többek között a génáramlás (gene flow), a genetikai sodródás (genetic drift) és a szelekció együttesen alakítja ([Liu & Cordes 2004](#)). Molekuláris mechanizmusát tekintve DNS-replikáció során kialakuló valamely mutációs esemény (például slippage következtében inszerció) vagy rekombináció (egyenlőtlen crossing over, génkonverzió) során manifesztálódnak ([Harding et al. 1992](#); [Tachida & Iizukat 1992](#)). A

populációk közti genetikai távolságok meghatározásával törzsfák szerkeszthetők, amik tükrözik az evolúciós kapcsolatokat is. Ennek meghatározására leggyakrabban a Nei-féle genetikai távolságmérést használják (Nei et al. 1983). A törzsfaszterkesztéshez az UPGMA (Unweighted Pair Group method using Arithmetic Averages) vagy a NJ (Neighbor Joining) algoritmusok a leggyakrabban alkalmazott számítási módok (Lemey et al. 2009).

2.5 A vizsgált fajok bemutatása

2.5.1 Süllő (*Sander lucioperca*)

A süllő Közép- és Kelet-Európában őshonos ragadozó halfaj, azonban az elmúlt évtizedekben Dél- és Nyugat-Európa, továbbá Kis-Ázsia édes és felsős vizeibe is behurcolták. Különösen értékes ízletes és szálkaszegény húsának köszönhetően. Hűvösebb, oxigénben gazdag, kemény aljzatú, iszapszegény álló és folyóvizeinkben egyaránt megtalálható. Különösen érzékeny az oxigénszintre és a hőmérsékletre; nagy területre van szüksége (különösen szaporodási időszakban). Amennyiben ez a terület nem áll rendelkezésre, az ivadékok száma jelentősen lecsökkenhet a kannibalizmus miatt (Horváth & Staszny 2013). Zsákmányoló életmódja miatt más fajok populációinak szabályozásában is szerepet játszik (Gharibkhani et al. 2009) így jelentős ökológiai értéket képvisel. Ökológiai jelentősége abban is megmutatkozik, hogy a süllő csúcsragadozóként kiválóan alkalmas az ún. gyomhalak vagy invazív halfajok visszaszorításában, mint ahogyan azt a kínai razbóra esetében láthatjuk (Csorbai 2015). A süllő természetes elterjedési területén előforduló populációiról és mesterségesen létrehozott állományairól megjelent néhány tanulmány, alább ezek közül mutatjuk be a legjelentősebbeket.

Az 1990-es években a halak tanulmányozásában leginkább elterjedt genetikai markerek az alloenzimek, a mitokondriális DNS markerek, valamint a PCR-RFLP markerek voltak, a süllő vizsgálata során is. Billington és munkatársai a *Percidae* család *Stizostedion* nemzetségéhez (*Sander* nemzetség korábbi megnevezése) tartozó 3 jelentősebb faj (észak-amerikai fajok: *S. canadense*, *S. vitreum*, európai faj: *S. lucioperca*) evolúciós kapcsolatát kezdték feltárni alloenzimekkel és mitokondriális DNS marker vizsgálatokkal (Billington et al. 1990), mely vizsgálatba később további fajokat - *S. volgense* (Billington et al. 1991) - *Perca fluviatilis* és *P. flavescens* (Billington 1998) - is bevontak, valamint további markereket is alkalmaztak vizsgálataik során. Ezeknek a tanulmányoknak ekkor még „csupán” annyi volt a céljuk, hogy a vizsgált fajok közötti evolúciós kapcsolatokat tárják fel. Az eredmények rávilágítanak annak fontosságára, hogy a taxonómia kialakításában ezeknek a genetikai információnak óriási a jelentőségük, azonban a hagyományos taxonómiai módszerek (mint például a morfológia) sem elhanyagolhatóak. A vizsgálat szerint a *Sander* és *Perca* fajok jelenlegi természetes elterjedése többségében tükrözi a kapcsolatuk szorosságát

(szoros kapcsolat az európai fajok között, valamint szoros a kapcsolat az észak-amerikai fajok között), azonban azt is megfigyelték, hogy a *S. marinus* faj (mely a Fekete-tengerben és a Kaszpi-tengerben található meg), egy „köztes” *Sander*-fajnak tekinthető: átmeneti tulajdonságokat mutat az észak-amerikai *Sander*-fajok (*S. canadensis*, *S. vitreus*) valamint az európaiak (*S. lucioperca*, *S. volgensis*) között, attól függetlenül, hogy a faj csupán Európában található meg. A *Percidae* család molekuláris filogenetikai analízisét Sloss és munkatársai folytatták tovább, immáron mitokondriális DNS szekvencia alapján (Sloss et al. 2004) és már nem csupán a *Perca* és *Sander* nemzetségeket, hanem a családhoz tartozó valamennyi nemzetséget vizsgálták. Ezeket a nemzetségeket jelenleg – immáron figyelembe véve a mitokondriális DNS szekvencia alapú analízis eredményeit is– 4 filogenetikai csoportba sorolták (*Etheostomatinae*, *Luciopercinae* alcsaládok, továbbá *Perca* és a *Gymnocephalus* nemzetségek).

A 2000-es években a mikroszatellitek jelentősége a populációgenetikában egyre növekedett, hiszen a polimorfitásuk jóval nagyobb, az értékelhetőségük egyszerűbb, valamint a genomi DNS nem kódoló régióiról is információt kapunk. A *Percidae* család *Sander* nemzetségébe tartozó 5 faj (*Sander lucioperca* süllő, *S. volgensis* kősüllő, *S. marinus* tengeri süllő, *S. vitreus* északi süllő, valamint *S. canadensis*) közül csupán a *S. vitreus* (Borer et al. 1999; Wirth et al. 1999; Coykendall et al. 2014), valamint a *S. lucioperca* (Kohlmann & Kersten 2008; Han et al. 2016) fajokból izoláltak fajspecifikus mikroszatelliteket (A *S. lucioperca* fajból eddig izolált markereket alább mutatjuk be részletesebben). Sok esetben más halfajokból izolált markereket is sikeresen alkalmaztak (adaptációt követően), mint ahogyan ezt Wirth és munkatársai (1999) bemutatják: a *S. vitreus* fajból fejlesztett 11 mikrosatellittel vizsgálták a *S. canadensis*, a *S. lucioperca*, a *Perca flavescens*, valamint a *P. fluviatilis* fajokat. A markeradaptáció a legközelebbi rokonságban álló fajban (*S. canadensis*) volt a legsikeresebb. Nem csupán a *Sander* nemzetség képviselőiből izolált mikrosatelliteket, hanem *Perca* nemzetséghez tartozó fajokból izolált markereket is tudták sikeresen adaptálni *Sander* fajokra, ahogyan ennek példáját Leclerc és munkatársai tanulmányában láthatjuk (2000). Az azonban minden vizsgálatban jól nyomon követhető, hogy az adaptációnak jelentős korlátai vannak, ugyanis a legtöbb esetben a rokon fajból izolált mikrosatellit közel sem mutat olyan magas polimorfitást, mind abban a fajban, amelyből fejlesztették (Yue et al. 2010). Mégis sokak által kedvelt módszer, amennyiben sikerül olyan markereket találni a már meglévők közül, amelyek nem veszítették el teljesen a polimorfitásukat, hiszen ezekkel a markerekkel megspórolható az izolálás, továbbá jóval gyorsabbá és olcsóbbá válnak az analízis fajlagos költségei.

A génbankban jelenleg (2017. augusztus 22.) 59 db süllőből fejlesztett mikrosatellit szekvencia található, azonban ezek közül csupán 27-et alakítottak

genetikai markerré. Kohlmann & Kersten 9 mikroszatellit (2008), Han és munkatársai további 18 polimorf markert izoláltak (2016) süllőből. Ezeknek a markereknek a működőképességét ugyan vizsgálták egy alacsonyabb mintaszámú csoporton (25, valamint 30 egyed), de a markerfejlesztéshez kapcsolódó vizsgálatokban populációgenetikai analízist nem végeztek. A Kohlmann és Kersten által leírt süllő-specifikus markereket először Khurshut és Kohlmann használták fel aral-tavi süllő állományok diverzitásának vizsgálatára (Khurshut & Kohlmann 2009), később Barmintseva és munkatársai kazasztáni állományok (Barmintseva et al. 2014), Louati és munkatársai franciaországi állományok (Louati et al. 2016), valamint Eschbach és munkatársai németországi állományok vizsgálatára használták ezeket a süllő-specifikus markereket (Eschbach et al. 2014). További süllő állományokat vizsgáltak szintén populációgenetikai szempontból *Sander vitreus* és *Perca flavescens* fajokból izolált mikroszatellitokkal a Skandináv félsziget édes vizeiben, valamint a Balti-tenger felsős öbleiben (Björklund et al. 2007; Saisa et al. 2010; Salminen et al. 2012), Franciaországban a Rhone folyó delta torkolatában (Poulet et al. 2009), és a Kaszpi-tengerben (Gharibkhani et al. 2009). Ezek a tanulmányok jól tükrözik, hogy a faj őshonosnak vélt elterjedési területről számos helyen végeztek már populációgenetikai analízist, azonban a Duna vízgyűjtő területén élő süllő populációkról még igen hiányosak az ismereteink. A fenti tanulmányok (marker fejlesztések és populációgenetikai vizsgálatok) legfontosabb eredményeit a 2. táblázat tartalmazza.

2.5.2 Sügér (*Perca fluviatilis*)

A sügér Észak-Amerika és Eurázsia-szerte elterjedt, Közép- és Kelet-Európában valamint Ázsia nyugati területein őshonos ragadozó halfaj. Kedvelt a sporthorgászok körében, de igen keresett árucikk értékes és ízletes, szálfaszegény húsának köszönhetően. A süllőhöz hasonlóan a népes *Percidae* család képviselője. Rendszerint lassú vízfolyású folyó-, valamint iszapszegény állóvizeket népesít be. A FAO adatai szerint (FAO 2014, 2017) jelenleg a fogásokból származó mennyiség két nagyságrenddel meghaladja az akvakultúrából származó mennyiséget. A termelési adatok világosan tükrözik, hogy a fogásingadozások igen jelentősek, így a megnövekedett fogyasztói igények nem kielégíthetőek. Ahhoz, hogy a termelés kiegyensúlyozottabb legyen, a sikeres tartástechnológiai fejlesztésekhez a faj mélyrehatóbb – molekuláris genetikai - ismerete is szükséges. Számos kutatócsoport vizsgálta az elmúlt évtizedekben is a sügér genetikai szempontból, melynek legjelentősebb tanulmányait az alábbiakban foglaljuk össze.

A '90-es években a sügér genetikai variabilitás vizsgálatát alloenzim (Heldstab & Katoh 1995), később mitokondriális DNS vizsgálatok (Nesbo et al. 1998), majd hamarosan (Nesbo et al. 1999) RAPD analízis alapján határozták meg. Azonban Leclerc és munkatársai (2000) leírják, hogy egy faj populációgenetikai szerkezetének részletes leírásához, valamint mélyreható filogeográfiai jellemzéséhez az alloenzimek és a

mitokondriális DNS, mint genetikai markerek, nem elegendőek. Leclerc és munkatársai 10 (2000), majd Li és munkatársai (2007) 32 mikroszatellit markert izoláltak *Perca flavescens*-ből, majd ezek közel-rokon fajokban való alkalmazhatóságát vizsgálták, többek között *Perca fluviatilis*-en is. Zhan és munkatársai (2009) nem csupán genomi DNS-ből fejlesztettek mikroszatelliteket, hanem cDNS-ből is, tehát olyan mikroszatellit szekvenciákat határoztak meg, amely a DNS kódoló régióin belül találhatóak. Ezek a mikroszatellitek ugyan alkalmasabbak QTL analízishez, de diverzitásbecslésre kevésbé. Gerlach és munkatársai (2001) *Sander vitreus* fajból izolált mikroszatellitekkel vizsgálták a Bodén-tó sügérállományának genetikai diverzitását, mely vizsgálat arra is rávilágított, hogy a sügér a vizsgált élőhelyen szubpopulációkba tömörül, és hogy az egyes szubpopulációkat közeli rokonok alkotják, sőt, a genetikai markereket ebben a tanulmányban a viselkedéskutatásba is bevonták. Mivel a szubpopulációk közötti génáramlás korlátozott vagy éppen teljesen akadályozva van, ezért a mikroszatellitek segítségével detektálható a genetikai differenciálódás – szubpopulációs szinten is (Bergek & Björklund 2007; 2009; Bergek et al. 2010; Olsson et al. 2011). Kahilainen és munkatársai (2011) Ny-Finnországban találtak *Sander lucioperca* és *Perca fluviatilis* hibrid egyedeket. Mind morfológiai, mind genetikai vizsgálatok (mikroszatellit analízis) alapján azt tapasztalták, hogy a hibrid sok tulajdonság tekintetében köztes jellegeket hordoz. Rolli és munkatársai (2014) mikroszatellitekkel határozták meg a vizsgált sügér populációk származását, referencia csoportokhoz viszonyítva, ami azért is jelentős, mert a halhús árát a származása is befolyásolja. Pukk és munkatársai 2013-ban megjelent közleményükben hangsúlyozzák, hogy az észak-tországi sügérállományok erős fluktuációja a szabályozatlan halászatnak és az illegális halkitermelésnek köszönhető. Tanulmányukban szorgalmazzák a szabályozás és nyomon követhetőség mielőbbi kidolgozását (Pukk et al. 2013). Hamarosan létre is hoztak egy olyan mikroszatellit alapú tesztrendszert sügérre, amely genetikai alapon azonosítja a földrajzi eredetet, hogy ezzel a pontosabb származásellenőrzéssel visszaszoríthassák az illegális halkitermelést és halkereskedelmet (Pukk et al. 2016). Ezt a tesztrendszert *Perca fluviatilis*-ből újgenerációs szekvenálási módszer segítségével izolált mikroszatellitekből hozták létre (Pukk et al. 2014). Fontos azonban azt is kiemelni, hogy a sügérből leelőször Yang és munkatársai (2009) izoláltak mikroszatelliteket. Az izolált markerekkel vizsgáltak kínai állományokat, és azt tapasztalták, hogy Kínában - a sügér természetes elterjedési területének keleti határán - a sügér genetikai diverzitása csekély (Yang et al. 2012). Khadher és munkatársai intenzív tenyésztésbe bevont és vad sügér állományokat vetettek össze, mégpedig abból az aspektusból, hogy az intenzív tenyésztésbe bevont (házasított) sügér genetikailag miként változott meg a vad sügérhez képest. A genetikai variabilitás összehasonlítására *Perca flavescens*-ből és *Sander vitreus*-ből izolált mikroszatellitekkel végezték az analízist. A tanulmány szerint a „házasított” sügér megváltozása nem csupán genetikailag kimutatható,

hanem fiziológiai, viselkedésbeli, morfológiai és szaporodásbiológiai elváltozást is megfigyeltek ([Khadher et al. 2016](#)).

Míg a süllő esetében a természetes elterjedési területről számos populációgenetikai tanulmány jelent meg, addig a sügér esetén a tanulmányok sokkal specifikusabb kérdések megválaszolása kapcsán kerültek előtérbe. Ilyenek például a közeli családtagokból kialakuló szubpopulációk létrejöttének mechanizmusa ([Bergek & Björklund 2007](#); [2009](#); [Bergek et al. 2010](#)); vagy az, hogy a sügért érzékeny mivolta miatt bioindikátornak is használják ([Khadher et al. 2015](#)); vagy egy olyan tesztrendszer kidolgozása, ami a halhús nyomon követhetőségét teszi lehetővé ([Pukk et al. 2016](#)); vagy miként kolonizálta az európai vizeket a sügér az utolsó jégkorszak óta ([Nesbo et al. 1999](#)). Ezekben a tanulmányokban olyan általános érvényű következtetéseket is levontak (vagy éppen egy kiváló példaként szolgáló esettanulmányt mutattak be), amelyek már túlmutattak a *P. fluviatilis* fajon.

Süllő és sügér (valamint közelrokon fajok) mikroszatellitek fejlesztéséről, valamint a mikroszatellitek alkalmazó legjelentősebb populációgenetikai kutatásokat a 2. táblázat összegzi.

2. táblázat. A *Sander* és *Perca* nemzetségek jelentős képviselőiből izolált mikroszatellitok bemutatása, valamint ezeknek a markereknek populációgenetikai alkalmazása a *S. lucioperca* és *P. fluviatilis* fajokban.

Marker fejlesztés

Tanulmány	Mely fajból izolálták a mikroszatellitot?	Markerek	Milyen fajt vizsgáltak?	Megjegyzés
Borer et al. (1999)	<i>Stizostedion vitreum</i> (jelenlegi megnevezése: <i>Sander vitreus</i>)	Svi4, Svi6, Svi17, Svi18, Svi26, Svi29, Svi33	<i>S. vitreus</i> , <i>Perca flavescens</i>	<i>Perca flavescens</i> faj esetén a működő markerek: Svi4, Svi18, Svi33.
Wirth et al. (1999)	<i>Stizostedion vitreum</i> (jelenlegi megnevezése: <i>Sander vitreus</i>)	Svi L1, Svi L2, Svi L3, Svi L4, Svi L5, Svi L6, Svi L7, Svi L8, Svi L9, Svi L10, Svi L11	<i>S. vitreus</i> , <i>S. canadensis</i> , <i>P. flavescens</i> , <i>S. lucioperca</i> , <i>P. fluviatilis</i>	<i>S. vitreus</i> fajban mind a 11 marker polimorf. <i>S. canadensis</i> fajban működnek Svi L2-L11 és ezek mind polimorfak. <i>P. flavescens</i> fajban működő markerek: Svi L1 (monomorf), Svi L6, Svi L8, Svi L10 és Svi L11 (monomorf). <i>S. lucioperca</i> fajban működő mikroszatellitok Svi L2, Svi L4 (monomorf), Svi L6 (monomorf)-Svi L11 markerek. <i>P. fluviatilis</i> fajban pedig Svi L1, Svi L4 (monomorf), Svi L6, Svi L7, Svi L10, Svi L11 (monomorf) markerek.
Leclerc et al. (2000)	<i>P. flavescens</i>	Pfla L1, Pfla L2, Pfla L3, Pfla L4, Pfla L5, Pfla L6, Pfla L7, Pfla L8, Pfla L9, Pfla L10	<i>P. fluviatilis</i> , <i>S. canadensis</i> , <i>S. lucioperca</i> , <i>S. vitreus</i>	A szerző megemlíti, hogy a fejlesztett markerek közül mind polimorf volt a <i>P. flavescens</i> fajban, 8 volt működőképes a <i>P. fluviatilis</i> fajban, valamint, hogy a markerek fele működött a <i>Sander</i> fajokban.
Li et al. (2007)	<i>P. flavescens</i>	YP6, YP7, YP9, YP13, YP16, YP17, YP28, YP30, YP41, YP49, YP55, YP60, YP62, YP65, YP66, YP68, YP71, YP73, YP78, YP79, YP80, YP81, YP84, YP85, YP96, YP99, YP106, YP108, YP109, YP110, YP111, YP113	<i>S. canadensis</i> , <i>S. vitreus</i> , <i>P. fluviatilis</i> , <i>Percina peltata</i>	Az izolált 32 markerből 25 a <i>P. fluviatilis</i> fajban is működött.
Kohlmann & Kersten (2008)	<i>S. lucioperca</i>	MSL-1, MSL-2, MSL-3, MSL-4, MSL-5, MSL-6, MSL-7, MSL-8, MSL-9,	<i>S. lucioperca</i>	A markereket kimutató PCR reakciókat multiplexálták is (3-féle szettet kialakítva).

Zahn et al. (2009)	<i>P. flavescens</i>	YP23, YP72, YP86, YP89, YP90, YP94, YP95, YP105 (genomi mikroszatellitiek); PFE01, PFE03, PFE06, PFE07, PFE08, PFE11, PFE12, PFE14, PFE15, PFE19, PFE20, PFE22 (mikroszatellitiek cDNS-ről)	<i>P. flavescens</i> , <i>S. vitreus</i>	A markerfejlesztés részben genomi DNS-ről részben cDNS-ről történt. A fejlesztett markereket 30 <i>P. flavescens</i> egyedén tesztelték, továbbá <i>S. vitreus</i> fajban is kipróbálták működőképességüket.
Yang et al. (2009)	<i>P. fluviatilis</i>	HL13, HL36, HL41, HL17, HL1, HL18, HL61, HL64, HL50, HL10, HL11, HL12	<i>P. fluviatilis</i>	Kína Xinjiang tartományának Ulungur nevű tavában található sügér populáció diverzitását határozták meg az újonnan fejlesztett markerekkel. A markerek 2/3-ának PIC értéke az igen informatív csoportba sorolható (PIC>0,5).
Coykendall et al. (2014)	<i>S. vitreus</i>	Svit038, Svit048, Svit049, Svit053, Svit054, Svit055, Svit056, Svit060, Svit098, Svit100, Svit101, Svit103, Svit104, Svit105, Svit106, Svit109, Svit115, Svit116	<i>S. vitreus</i> , <i>S. canadensis</i>	<i>S. vitreus</i> fajban mind a 18 marker működőképes, polimorf, azonban a <i>S. canadensis</i> fajban csupán a Svit053, Svit055, Svit060, Svit098, Svit101, Svit103, Svit104, Svit105, Svit115, Svit116 markerek polimorfak.
Han et al. (2016)	<i>S. lucioperca</i>	SI11, SI19, SI51, SI52, SI57, SI117, SI124, SI136, SI148, SI165, SI166, SI167, SI174, SI176, SI176, SI183, SI186, SI192, SI195)	<i>S. lucioperca</i>	Meghatározták a markerek PIC értékeit: a markerek döntő többsége a mérsékelt informatív csoportba sorolható a PIC érték alapján (0,2<PIC<0,5).
Pukk et al. (2014)	<i>P. fluviatilis</i>	Pflu3068, Pflu5951, Pflu6750, Pflu6900, Pflu7009, Pflu7585, Pflu9296, Pflu9462, Pflu9896, Pflu10174, Pflu12189, Pflu13223, Pflu17171, Pflu26209, Pflu29376, Pflu29742, Pflu30072	<i>P. fluviatilis</i>	A markerek fejlesztéséhez Ion Torrent szekvenáló platformot használtak. Az újonnan fejlesztett markerek (17 polimorf) működőképességét 2 csoporton vizsgálták (1 balti-tengeri és egy Peipus tavi - Észtország - állományon).

Populációgenetikai tanulmányok - *Sander lucioperca*

Tanulmány	Mely fajból izolálták a mikroszatellit / tanulmány	Markerek	Hol történt a vizsgálat?	Megjegyzés
Björklund et al. (2007)	<i>S. vitreus</i> / Borer et al. (1999); Wirth et al. (1999); <i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000)	Svi4 / Svi L7, Svi L8, Svi L10, Svi L11 / Pfla L3	Svédország és Finnország egyes vizeiben élő süllő-állományok diverzitásbecslését végezték el.	A tanulmányban a fennoskandináviai régió északi és déli területeinek süllő állományait hasonlítja össze. A diverzitásbecslés alapján a génáramlás és génsodródás jelenségeit követi nyomon.
Poulet et al. (2009)	<i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000); <i>S. vitreus</i> / Borer et al. (1999) / Wirth et al. (1999)	Pfla L3 / Svi L10, Svi L11, Svi L7, Svi L8 / Svi4	Rhone folyó delta torkolatánál vizsgálták a süllő állományokat.	A tanulmány a süllő Rhone folyó delta szakaszának kolonizációs mechanizmusait tárja fel.
Gharibkhani et al. (2009)	<i>P. flavescens</i> / Li et al. (2007) / Leclerc et al. (2000)	YP13, YP60, YP110 / Pfla L3, Pfla L8, Pfla L9	Kaszipi-tenger DNY-i részén 3 süllőállományának vizsgálták a genetikai szerkezetét.	A vizsgált állományok közötti genetikai differenciáltság nem túl magas, bár a különbség köztük szignifikáns. A vizsgált markerek mind <i>P. flavescens</i> fajból származnak.
Khurshut & Kohlmann (2009)	<i>S. lucioperca</i> / Kohlmann & Kersten (2008)	MSL-1, MSL-2, MSL-3, MSL-4, MSL-5, MSL-6, MSL-7, MSL-8, MSL-9	Aral-tavi (Üzbegisztán) süllőállományok vizsgálata.	Megfigyelték a természetesen előforduló populációk és betelepített állományok közötti introgressziót.
Saisa et al. (2010)	<i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000); <i>S. vitreus</i> / Borer et al. (1999) / With et al. (1999)	Pfla L2, Pfla L3, Pfla L8, Pfla L9 / Svi4, Svi6, Svi18, Svi33 / Svi L7, Svi L8, Svi L9, Svi L11	A Balti-tenger vízgyűjtő területének északi térségében (Finnország) hasonlítja össze az édesvízi és tengeri süllőállományok diverzitását.	A tanulmány szerint a vizsgálatba bevont közösségek genetikai differenciáltsága jelentős ($F_{ST} = 0,25$), az édesvízi állományokban nagyobb, a tengeriekénél kisebb.
Salminen et al. (2012)	<i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000); <i>S. vitreus</i> / Borer et al. (1999) / With et al. (1999)	Pfla L3, Pfla L8 / Svi4, Svi6, Svi18, Svi33 / Svi L7, Svi L8, Svi L11	Finnországi tavak süllőállományainak vizsgálata.	A tanulmány a vizsgált tavak természetes szaporulat okozta / mesterséges betelepítések következtében kialakuló kolonizációnak a mechanizmusát kívánta feltárni, e kapcsán vizsgálta a süllőállományok diverzitását.

Barmintseva et al. (2014)	<i>S. lucioperca</i> / Kohlmann & Kersten (2008); <i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000); Li et al. (2007)	MSL-3, MSL-4, MSL-5, MSL-7 / Pfla L3 / YP13	Kazasztán és Oroszország a vizsgálati terület (Volga, Urál, Aral-tó, Balhás-tó), süllő és kősüllő (<i>S. volgensis</i>) állományokat vizsgáltak.	Az alkalmazott markerek mind kiemelkedően polimorfnek bizonyultak <i>S. lucioperca</i> fajban. Továbbá a tanulmányban genetikai úton bizonyították, hogy a kősüllő és a süllő nem hibridizál a vizsgált élőhelyeken.
Eschbach et al. (2014)	<i>S. lucioperca</i> / Kohlmann & Kersten (2008)	MSL-1, MSL-2, MSL-3, MSL-4, MSL-5, MSL-6, MSL-7, MSL-8, MSL-9,	Németországi süllőállományok vizsgálata.	A vizsgálat arra irányult, hogy a süllő miként kolonizálta Németország nagyobb vizeit, továbbá a kapott eredményekből általános érvényű következtetéseket vontak le az utolsó jégkorszak utáni kolonizáció folyamatairól.
Louati et al. (2016)	<i>S. lucioperca</i> / Kohlmann & Kersten (2008)	MSL-1, MSL-2, MSL-3, MSL-4, MSL-5, MSL-6, MSL-7, MSL-8, MSL-9	Franciaországi és tunéziai süllő állományok vizsgálata.	A francia süllő állományok diverzitása a vizsgált populációkban relatíve magas - a szerzők szerint a több forrásból történt betelepítéseknek köszönhetően.

Populációgenetikai tanulmányok - *Perca fluviatilis*

Tanulmány	Mely fajból izolálták a mikroszatellit / tanulmány	Markerek	Hol történt a vizsgálat?	Megjegyzés
Gerlach et al. (2001)	<i>S. vitreus</i> / Borer et al. (1999)	Svi6, Svi17, Svi18, Svi26, Svi29	Németországi és svájci sügérállományok (összesen 9) vizsgálata.	A tanulmány azt kívánja genetikai alapokon igazolni, hogy a populációkon belül kisebb szubpopulációk a közeli rokonok ("családok") szoros együttéléséből alakulnak ki.
Bergek & Björklund (2007)	<i>S. vitreus</i> / Wirth et al. (1999); <i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000)	Svi L4, Svi L7, Svi L10, Svi L11 / Pfla L1, Pfla L3, Pfla L6, Pfla L9	Erken-tó sügérállományainak vizsgálata (Svédország).	A tanulmány a sügér szubpopulációinak kialakulását tárja fel. Ezek a szubpopulációk egy ilyen kisméretű tóban is fellelhetőek (24 km ²).
Bergek & Björklund (2009)	<i>S. vitreus</i> / Wirth et al. (1999); <i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000)	Svi L7, Svi L10, Svi L11 / Pfla L1, Pfla L3, Pfla L5, Pfla L9,	Svédország Balti-tengeri szigetvilága (K) mentén élő sügérállományok vizsgálata.	A tanulmány nem csupán genetikailag mutatja ki a különbséget a sügér szubpopulációi között, hanem morfológiai különbségeket is leír.

Bergek et al. (2010)	<i>S. vitreus</i> / Wirth et al. (1999); <i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000)	Svi L4, Svi L7 / Pfla L1, Pfla L3, Pfla L5, Pfla L9,	Svédország Balti-tengeri szigetvilága (É) mentén élő sügérállományok vizsgálata.	A jelen kutatás fő eredménye az, hogy a földrajzi távolságon alapuló elkülönülés nem az egyetlen genetikai differenciálódást előidéző mechanizmus, és hogy az ívás során a nagyon kisméretű környezeti feltételek befolyásolhatják a genetikai differenciálódás mintáját.
Olsson et al. (2011)	<i>S. vitreus</i> / Wirth et al. (1999); <i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000)	Svi L7, Svi L10, Svi L11 / Pfla L1, Pfla L9	Svédország Balti-tengeri partja mentén vizsgálja a sügérpopulációkat.	A sügérállományok genetikailag 2 nagyobb egységet alkotnak: közép Balti-tengeri és Bothnia öböl állományai.
Kahilainen et al. (2011)	<i>Gasterosteus aculeatus</i> / Shikano T. (Universal microsatellite markers in fish. Department of Biosciences, University of Helsinki, 2010, unpublished)	PUMF6, PUMF9, PUMF22, PUMF23, PUMF27, PUMF63, PUMF65, PUMF69m, PUMF71	Finnországban talált természetes süllő-sügér hibrid genetikai vizsgálata mikroszatellittekkel.	A talált hibrid mind genetikailag, mind morfológiailag köztes jellegeket visel.
Rolli et al. (2014)	<i>S. vitreus</i> / Borer et al. (1999)	Svi6, Svi17, Svi18, Svi26, Svi29	Svájci sügér populációk vizsgálata.	Az alkalmazott mikroszatellittekkel létrehoztak egy olyan tesztrendszert, amellyel meg tudják határozni a vizsgált egyed származását. Ez azért nagyon fontos, mert a hús ára a származás függvényében változó.
Pukk et al. (2013)	<i>S. vitreus</i> / Borer et al. (1999); Zhan et al. (2009)	Svi6, Svi18 and Svi33 / PFE01, PFE03, PFE11, PFE12, PFE14, PFE15, PFE19, PFE22	Észtország Ny-i partja mentén vizsgáltak 5 sügérpopulációt. A szabályozatlan halászat okozta populációs fluktuációkat követték nyomon.	A tanulmány felhívja a figyelmet, hogy a kontrollálatlan halászata a populációk összeomlásához vezet. Szükség van a populációk állapotának felmérésére és a halászat, valamint a telepítések ésszerű szabályozására.
Pukk et al. (2016)	<i>P. fluviatilis</i> / Pukk et al. (2014)	Pflu3068, Pflu5951, Pflu6750, Pflu6900, Pflu7009, Pflu7585, Pflu9296, Pflu9462, Pflu9896, Pflu10174, Pflu12189, Pflu13223, Pflu26209, Pflu29376, Pflu29742, Pflu30072	Észtország Ny-i partján, valamint a Peipus-tavi sügerek összehasonlító vizsgálata.	Az alkalmazott markerekkel sikeren elkülönítették a vizsgált sügerek pontos származását. A fogyasztók számára genetikai módszerrel is biztosítható a halhúsból készült termékek nyomon követhetősége.

Khadher et al. (2016)	<i>P. flavescens</i> / Leclerc et al. (2000); Li et al. (2007); <i>S. vitreus</i> / Wirth et al. (1999); Borer et al. (1999)	Pfla L1, Pfla L2, Pfla L4, Pfla L6, Pfla L9, Pfla L10 / YP60, YP78, YP111 / Svi L7 / Svi17, Svi18	Franciaországi sügér populációk és állományok genetikai összehasonlító vizsgálata.	A kutatásban 9 tenyésztett állomány és 1 természetes populáció (Genfi-tó) sügérállományainak diverzitását, valamint a közösségek szerkezetét határozták meg a tenyésztés fejlesztése céljából.
-----------------------	--	---	--	--

2.5.3 Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*)

Az afrikai harcsa a *Clariidae* család afrikai kontinensen élő őshonos faja. Mára már Európában (Hollandia, Magyarország, Olaszország), Ázsiában (Kína, India, Thaiföld) és D-Amerikában (Brazília) is jelentős mennyiségben előállított halfaj (intenzív körülmények között), ugyanis szálfaszegény, ízletes húsa miatt igen kedvelté vált. Magyarországon az afrikai harcsa a második legnagyobb mennyiségben előállított halfaj a pontyot követően, és az ország megközelítőleg 3000 tonnás termelésével Európában az egyik vezető termelő (FAO 2017). Az intenzív tenyésztési technológia kidolgozása már a '90-es években megtörtént, ami annak is köszönhető, hogy az afrikai harcsa jól tűri a zsúfoltságot, valamint nem kifejezetten érzékeny a víz O₂ tartalmára, ugyanis másodlagos légzőszervével a légköri O₂-t is képes hasznosítani. Érzékeny azonban a víz hőmérsékletre, de ez recirkulációs rendszerben viszonylag könnyen állandó szinten tartható. Az ellenállósága és jó alkalmazkodóképessége, stressz-tűrése abban is segítséget nyújt, hogy biológiai kutatásokba is bevonják, azonban a genetikai háttérrel még csekély információ áll rendelkezésre. A génbankban (NCBI) jelenleg (2017. június 12.) 22 db *Clarias gariepinus*-ból leírt mikroszatellit szekvencia található (NCBI 2017). Ezek közül 18-at sikerült működőképes markerré alakítani: 7-et Galbusera és munkatársai izoláltak (1996) 3-at Volckaert & Hellemans (1999), valamint 8-at Yue és munkatársai (unpublished data). Egy másik tanulmányban Yue és munkatársai *Clarias batrachus*-ból izoláltak 16, polimorf mikrosatellit, melyek működőképességét és polimorfítását 7 másik harcsafajon is tesztelték. Ezek közül a markerek közül az afrikai harcsában 12 polimorfnek, 1 monomorfnek bizonyult, a többi pedig nem amplifikálódott (Yue et al. 2003). Ugyanez a kutatócsoport megfigyelte, hogy a markerek adaptációja más fajokból gyakran vagy kisebb polimorfítású markerekként jelennek meg, vagy monomorf fragmenteket eredményeznek, vagy az analízis teljes mértékben eredménytelen, továbbá, hogy nem ortológ szekvencia amplifikációja is előfordulhat. Ezért ennek a jelenségnek a kiküszöbölése végett ajánlott a felszorzozott fragmentek szekvenciájának meghatározása, valamint a homológia és az ismétlődő szekvenciák jelenlétének igazolása (Yue et al. 2010). A markerek fejlesztésén túl számtalan olyan tanulmány is megjelent, ami korábban fejlesztett markerek (mint például alloenzimek, közel-rokon fajokból izolált mikrosatellit, mitokondriális DNS markerek) felhasználásával történtek. Grobler és Van der Bank (1994) alloenzimek segítségével keresték a genotípusos és a fenotípusos varianciák közti kapcsolatot, és azt tapasztalták, hogy a heteozigotizáció, valamint a fenotípusos variancia között pozitív korreláció áll fent, ami azt a konklúziót is vonja maga után, hogy a variancia vizsgálata alkalmas a szelektív nemesítés során végbemenő genetikai változások monitorozására. Na-Nakorn és munkatársai (2002) a *Clarias* genus-t és annak legjellemzőbb képviselőit vizsgálták, szintén alloenzimekkel. Az egyes fajok alkotó közösségek heterozigotizálásának meghatározásán túl a vizsgált fajok evolúciós kapcsolatát is meghatározta a Nei-féle

genetikai távolság alapján: a *C. gariepinus* közelebbi kapcsolatban áll a *C. meladerma* fajhoz, mint a *C. batrachus* és *C. macrocephalus* fajokból álló csoporthoz. Nakorn (1999) meghatározta azokat a genetikai faktorokat, amik a haltenyésztés során kiemelkedően fontosak - mindezt a *Clarias* fajok példáján bemutatta -, mint például a kromoszóma szám, a markerre alapozott szelekció (MAS) lehetősége, a fajon belüli variancia meghatározása, a fajok közötti hibridizáció lehetősége (előnyök és hátrányok figyelembe vételével), a monoszex állományok létrehozásához alkalmazható genommanipulációk lehetősége. Mohindra és munkatársai (2007) az alloenzimek mellett mitokondriális DNS markereket is alkalmaztak a *Clarias* genus vizsgálata során, melynek célja 3 faj (*C. gariepinus*, *C. batrachus*, *C. macrocephalus*) és a hibridjeik elkülönítése volt az általuk fejlesztett genetikai eszközrendszerrel. Wachirachakarn és munkatársai (2009) Tájféldön tenyésztett afrikai harcsa állományokat mikroszatellit markerekkel vizsgálták: azt tapasztalták, hogy a tájféldi afrikai harcsa genetikai variancia szempontjából 2 csoportra különül el. A genetikailag különálló csoportokat keresztezték, majd az utódállományban megfigyelték, hogy a 2 csoport között heterózis révén egy olyan állományt hoztak létre, amely növekedésében, túlélésben és a betegségekkel szembeni ellenállóság tekintetében kiemelkedőnek bizonyult a szülői állományokhoz képest. Megfogalmazták azt az alapvető igazságot, hogy az akvakultúra - genetikai tervezés nélkül - a gazdasági szempontból fontos állományoknak csupán csak genetikai leromlását idézheti elő. Nazia & Siti-Azizah (2014) *C. macrocephalus* fajból izoláltak mikroszatelliteket, abból a célból, hogy egy olyan genetikai eszközrendszert hozzanak létre, amely alkalmas arra, hogy a veszélyeztetett *C. macrocephalus* fajt genetikai eszközökkel (egyszerűen és gyorsan, az állat elpusztítása nélkül) meg tudják különböztetni más *Clarias* fajoktól és a hibridjeiktől. Ezilrani & Christopher (2015) *C. batrachus*, valamint *C. macrocephalus* fajokból korábban izolált mikroszatellitekkel (Yue et al. 2003; Sukkorntong et al. 2008) vizsgáltak dél-indiai afrikai harcsa populációkat. Meghatározták, hogy a vizsgált állományok genetikai szempontból 2 klaszterbe sorolhatóak, valamint ezzel a tanulmánnyal azt is szerették volna bemutatni, hogy a gazdasági szempontból értékes halak tenyésztéséhez elengedhetetlen a genetikai monitorozás. A dél-indiai állományok vizsgálatát ugyanez a kutatócsoport folytatta, immáron csak *C. macrocephalus* fajból izolált markerekkel (Sukkorntong et al. 2008). A vizsgált 4 tó afrikai harcsa állományai földrajzi elhelyezkedésük szerint 2 genetikai csoportot alkotnak (Chennai: Poondi-tó és Sholavaram-tó, valamint Bangaolre: Bellandur-tó és Varthur-tó) (Ezilrani et al. 2016). Awodiran és munkatársai (2019) nigériai afrikai harcsa populációk diverzitását hasonlították össze (Asejire és Lokoja) Galbusera és munkatársai által leírt *C. gariepinus* mikroszatellitekkel (Galbusera et al. 1996). Az állományok heterozigotitása magas, beltenyészettségük szintje alacsony, a HWE egyensúlytól azonban szignifikánsan eltérnek.

Az afrikai harcsából és közelrokon fajokból izolált mikroszatelliteket, valamint ezeket a markereket alkalmazó legjelentősebb populációgenetikai vizsgálatokat a 3. *táblázat* mutatja be.

A fenti tanulmányok számos olyan példát mutatnak be, amelyekben a genetikai markerek felhasználásának széles spektruma látható, valamint bemutatásra kerül az a tény is, hogy ezek a genetikai markerek az ökológiai monitorozásban rendkívüli fontossággal bírnak.

3. táblázat. A *Clarias* nemzetség jelentős képviselőiből izolált mikroszatellitok bemutatása, valamint ezeknek a markereknek populációgenetikai alkalmazása a *C. gariepinus* fajban.

Marker fejlesztés				
Tanulmány	Mely fajból izolálták a mikroszatellitot?	Markerek	Milyen fajt vizsgáltak?	Megjegyzés
Galbusera et al. (1996)	<i>C. gariepinus</i>	Cga01, Cga02, Cga03, Cga05, Cga06, Cga09, Cga10	<i>C. gariepinus</i> , <i>C. anguillaris</i> , <i>C. alluaudi</i> , <i>Heterobranchus longifilis</i>	A markerek működőképességét 38 afrikai harcsa egyeden tesztelték, továbbá közelrokon fajokon is sikeresen alkalmazták.
Volckaert & Hellemans (1999)	<i>C. gariepinus</i>	Cga04, Cga11, Cga14	<i>C. gariepinus</i>	A mikroszatellitok alkalmazása egy olyan tanulmánynak a részét képezte, amelyben a tenyésztést kívánték fejleszteni. A kutatás során a MS-eket az egyedek azonosításában használták.
Yue et al. (2002, unpublished)	<i>C. gariepinus</i>	Cga117, Cga119, Cga129, Cga168, Cga172, Cga315, Cga341, Cga345		
Yue et al. (2003)	<i>C. batrachus</i>	Cba01, Cba02, Cba03, Cba04, Cba05, Cba06, Cba07, Cba08, Cba09, Cba10, Cba11, Cba12, Cba13, Cba14, Cba17, Cba19, Cba20, Cba21	<i>C. batrachus</i> , <i>C. fuscus</i> , <i>C. gariepinus</i> , <i>C. macrocephalus</i> , <i>H. longifilis</i> , <i>H. fossilis</i> , <i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	A fejlesztett <i>C. batrachus</i> mikroszatellitok <i>C. gariepinus</i> -ban az alábbiak szerint működtek: monomorfnak bizonyult a Cba03 marker, az alábbiak pedig egyáltalán nem működtek: Cba04, Cba08, Cba10, Cba13, Cba14, Cba17. A Cba05 viszont nagyobb polimorfítást mutatott az afrikai harcsában, mint a <i>C. batrachus</i> -ban.

Nazia & Siti-Azizah (2014)	<i>C. macrocephalus</i>	NCm-A4, NCm-A5, NCm-D8, NCm-D11, NCm-F8, NCm-G12, NCm-H2, NCm-H6	<i>C. macrocephalus</i> , <i>C. batrachus</i> , <i>C. meladerma</i> , <i>C. gariepinus</i> , <i>C. nieuhofii</i>	A fejlesztett <i>C. macrocephalus</i> markerek PIC értékei a NCm-H2 marker kivételével mind igen magasak (PIC>0,74). Kutatásuk célja egy olyan genetikai eszkörendszer létrehozása, amely alkalmas arra, hogy a veszélyeztetett <i>C. macrocephalus</i> fajt genetikai eszközökkel (egyszerűen és gyorsan, az állat elpusztítása nélkül) meg tudják különböztetni más <i>Clarias</i> fajoktól és a hibridjeiktől.
Sukkorntong et al. (2008)	<i>C. macrocephalus</i>	Cmac1, Cmac2, Cmac3, Cmac4, Cmac5, Cmac6, Cmac7, Cmac8, Cmac9, Cmac10, Cmac11, Cmac12, Cmac13, Cmac14, Cmac15, Cmac16	<i>C. gariepinus</i> , <i>Pangasius hypophthalmus</i> , <i>P. larnaudii</i> , <i>Pangasianodon gigas</i>	A fejlesztett 16 marker közül 11-et tudtak alkalmazni a közelrokon fajok vizsgálatában, azonban alacsonyabb polimorfítást mutattak a markerek.

Populációgenetikai tanulmányok - *Clarias gariepinus*

Tanulmány	Mely fajtól izolálták a mikroszatellit / tanulmány	Markerek	Hol történt a vizsgálat?	Megjegyzés
Wachirachaikarn et al. (2009)	<i>C. gariepinus</i> / Galbusera et al. (1996)	Cga01, Cga02, Cga03, Cga06, Cga09, Cga10	Tájföldi afrikai harcsa állományok vizsgálata.	4 állomány diverzitását határozták meg: az állományok többségénél heterozigóta hiányt tapasztaltak, a 4 állomány egyike sincs Hardy-Weinberg egyensúlyban. A 4 állományt páronként keresztezték, heterozis hatás létrehozásának céljából.

Ezilrani & Christopher (2015)	<i>C. batrachus</i> / Yue et al. (2003); <i>C. macrocephalus</i> / Sukkorntong et al. (2008)	Cba12, Cba17 / Cmac6, Cmac11	Dél-indiai afrikai harcsa-állományok genetikai állapotának felmérését végezték el (tartományok: Vellore, Chennai, Bangalore)	A tanulmány szerint a vizsgált 3 állomány 2 genetikai egységet alkot (Chennai-Bangalore és Vellore). Az állományok nincsenek HWE egyensúlyban. Ezzel a tanulmánnyal azt is szerették volna bemutatni, hogy a gazdasági szempontból értékes halak tenyésztéséhez elengedhetetlen a genetikai monitorozás.
Ezilrani et al. (2016)	<i>C. macrocephalus</i> / Sukkorntong et al. (2008)	Cmac6, Cmac11	Dél-indiai afrikai harcsa-állományok genetikai állapotának felmérését folytatták Chennai és Bangalore tartományokban.	Bár az vizsgált populációk nincsenek HWE egyensúlyban, diverzitásuk átlagosnak mondható.
Awodiran et al. (2019)	<i>C. gariepinus</i> / Galbusera et al. (1996)	Cga01, Cga02, Cga03, Cga05, Cga06, Cga09, Cga10	Nigéria 2 afrikai harcsa populációjának összehasonlító genetikai analízise.	A vizsgált populációk heterozigotitása magas, beltényésztettség szintje alacsony, a HWE egyensúly nem áll fenn.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Mintagyűjtés

Süllő esetén összesen 376 egyedtől (10 populáció), sügér esetén 182 (3 populáció), valamint afrikai harcra esetén 32 egyedtől vettünk farokúszó mintát. A 4. táblázat összegzi a begyűjtött minták származását, mintavételi helyét, mintaszámát, valamint hogy mely populációtípusból származnak. A begyűjtött farokúszó mintákat -20°C-on tömény etanolban (Ethanol, Reanal) tároltuk DNS izolálásig.

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

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

3.2 DNS izolálás

A szövetmintákból fenol/kloroformos izolálási eljárással nyertük ki a DNS-t ([Sambrook & Russell 2001](#)). Az izolálás a szövet feltárással kezdődött. Ehhez fehérjebontó enzimet használtunk: 0,5 - 1 cm² méretű farokúszó szövetmintát 600 µl SET-pufferben (pH=8.00), 8 µl 20 mg/ml proteináz K enzim (Macherey-Nagel) hozzáadásával 55°C-on, egy éjszakán át rázó termosztátban inkubáltuk (150 rpm). A homogén szuszpenzióra 400 µl akvafenolt (Rothi-Phenol, Carl Roth) mértünk, alaposan összeráztuk, majd 1-2 perc várakozás után 14000 g erővel 15 percig 4°C-on centrifugáltuk. A felső vizes fázist óvatosan átmértük új, tiszta steril 1,5 ml-es

mikrocentrifugacsőbe. 400 µl akvafenol-t és 400 µl klorofomot (Chloroform, Reanal) mértünk a szuszpenzióra, alaposan összeráztuk, majd 1-2 perc várakozás után 14000 g erővel 15 percig 4°C-on centrifugáltuk. Ismét óvatosan átmértük a felső fázist új, tiszta steril 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőbe. 400 µl klorofomot mértünk a szuszpenzióra, alaposan összeráztuk, majd 1-2 perc várakozás után 14000 g erővel 15 percig 4°C-on centrifugáltuk. Ismét óvatosan átmértük a felső fázist új, tiszta steril 1,5 ml-es mikrocentrifugacsőbe. Óvatosan -20°C-os etanolt (Ethanol, Reanal) mértünk az átmért felülűszóra, majd a mintákat -20 °C-on hagytuk legkevesebb 2 órára. Ezt követően 20 percig 4°C-on 14000 g erővel centrifugáltuk a mintákat, majd az alkoholt leöntöttük a csapadékról. A csapadékot szárítottuk, majd steril vízbe oldottuk. Az izolálást követően a DNS minőségét agaróz (SeaKem LE Agarose, Lonza) géll elektroforézissel (1% agaróz, 1x TBE-puffer, 0,5 µg/ml etídium-bromid) vizsgáltuk és koncentrációját spektrofotométerrel (IMPLEN, NanoPhotometer) határoztuk meg. Az így kapott DNS-t kettős céllal használtuk fel: 20 µg DNS-t a könyvtárkészítésre, valamint 50 ng/µl koncentrációra kihígítva a mikroszatellit analízishez.

3.3 Könyvtárkészítés

Glenn és Schable (2005) módosított módszerével CA-dinukleotid ismétlődésekben dúsított genomi könyvtárakat (Ostrander et al. 1992) hoztunk létre. A könyvtárkészítéshez szükséges DNS-t hím egyedekből nyertük (ld. fent leírt protokoll szerint), mivel a vizsgált halfajokban a hímek a heterogamétások, (Rougeot et al. 2002; Galbusera et al. 2000) amelyek így mindkét ivari kromoszómát hordozzák. A süllő esetén a könyvtár készítéshez a hím egyedek a Dalmandi populációból származtak, sügér esetén a hím egyedek a dunaföldvári állományból kerültek ki, míg afrikai harcsa esetén a könyvtárkészítéshez szükséges hím egyedek Szarvasról származtak. A 20 µg genomi DNS-t tompa végeket adó restriktív enzimekkel hasítottuk (*Hae III* / *Alu I* / *Rsa I*, ThermoFisher Scientific/ *HpyCH4 V*, NewEngland BioLab) az 5. táblázat szerint. Az eredeti protokolltól ezen a ponton eltértünk, ugyanis Glenn és Schable által alkalmazott *BstU I* enzim túlságosan kisméretű fragmentekre hasította az általunk vizsgált fajok genomját, helyette a *HpyCH4 V* restriktív enzim bizonyult ideálisnak.

5. táblázat. A genomi DNS restriktív enzimekkel végzett hasításának reakciókörülményei.

20 µg DNS	20 µg DNS	20 µg DNS	20 µg DNS
0,5 U/µl <i>Hae III</i>	0,5 U/µl <i>Rsa I</i>	0,5 U/µl <i>Alu I</i>	0,5 U/µl <i>HpyCH4 V</i>
1x puffer (Red Buffer)	1x puffer (YellowTango)	1x puffer (Yellow Tango)	1x puffer (NEBuffer 4)

Inkubáció: 37°C, 12 óra

Agaróz (SeaKem LE Agarose, Lonza) géll (2% agaróz, 0,5 µg/ml etídium-bromid, 1x TBE-puffer) elválasztás után, a gélből a 300-1000 bp méretű DNS-szakaszokat izoláltuk vissza NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) kit segítségével a gyártó ajánlásai alapján. A fragment mennyiségét spektrofotométer (IMPLEN,

NanoPhotometer) segítségével határoztuk meg, majd 10 µg fragmentre foszfatáz kezelést (6. táblázat) követően (Shrimp Alkaline Phosphatase, ThermoFisher Scientific), BoxI linkert ligáltunk. (Az eredeti protokoll SuperSNX linker használatát javasolja, azonban ehelyett kutató csoportunk egy korábbi vizsgálata során létrehozott adapter konstrukcióját használtuk - *BoxI* adapter).

6. táblázat. A fragmentált DNS foszfatáz kezelésének reakciókörülményei.

100 µl végtérfogat	
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, ThermoFisher Scientific)	15 U
Tango-puffer (ThermoFisher Scientific)	1x
fragment DNS	10 µg

Inkubáció: 37°C, 1 óra, majd enzim inaktiváció 65°C-on, 15 percig

A BoxI linkerhez használt oligonukleotidok szekvenciája:

BoxI forward primer: 5'-Phos-ATGTCTGAAGGTACCACTGCTGTCCGAAA-3';

BoxI reverse primer: 5'-CGGACAGCAGTGGTACCTTCAGACAT-3'.

A BoxI linker előállítását az 7. táblázatban mutatjuk be. A linkert képző oligonukleotidok összeolvasztását Thermal Cycler készülékben végeztük (Applied Biosystems).

7. táblázat. A linker előállítás reakciókörülményei.

0,5 mM	BoxI forward primer	kezdeti denaturáció	95 °C
0,5 mM	BoxI reverse primer	hűtési sebesség	0,2 °C/másodperc
100 mM	Nátrium-klorid (NaCl)	végző hőmérséklet	20 °C

Az így elkészített adapter kapcsolását a 8. táblázatnak megfelelően 16°C-on egy éjszakán át végeztük. A reakcióelegyhez BoxI restriktív enzimet is mértünk, hogy a linker-linker komplexeket el tudjuk hasítani.

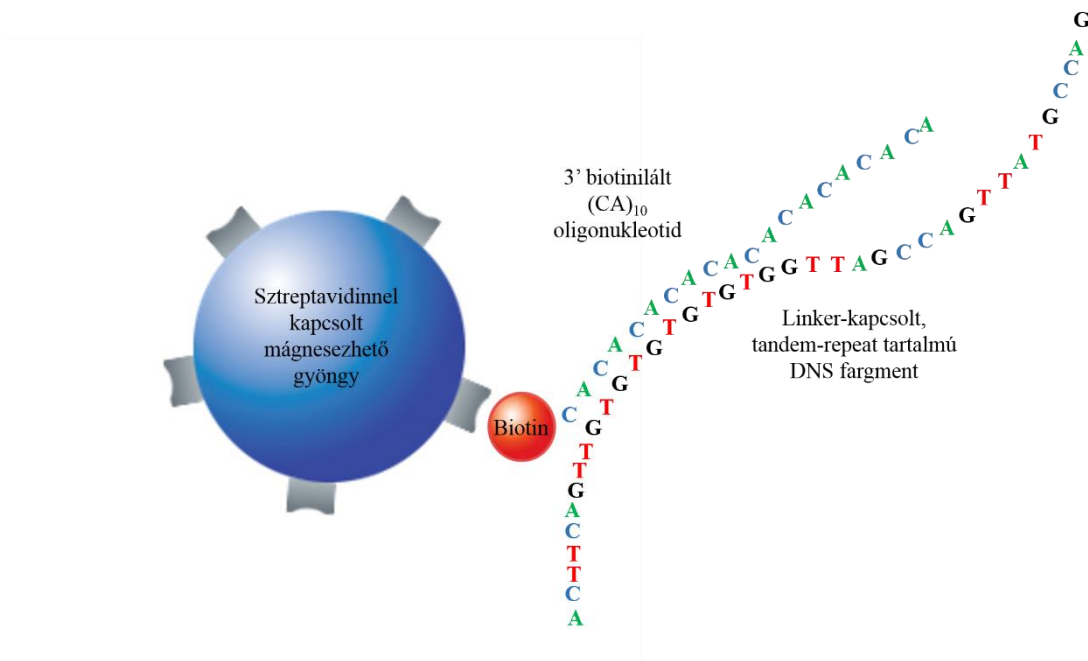
8. táblázat. A SAP kezelt DNS fragmentek végeire kapcsolt adapterek ligálási reakcióösszetétele.

10 µg-nyi	SAP kezelt DNS fragmentek
0,75 mM	BoxI linker
0,2 U/µl	BoxI enzim (ThermoFisher Scientific)
0,15 U/µl	T4 DNS ligáz (ThermoFisher Scientific)
1 mM	ATP (ThermoFisher Scientific)
0,5x	Tango puffer (ThermoFisher Scientific)
5%	PEG (ThermoFisher Scientific)

A linker kapcsolódását a linkerről induló PCR reakcióval igazoltuk. A PCR összetétele a következő volt: 25 µl végtérfogatban: 1x Taq-polimeráz puffer (KCl;

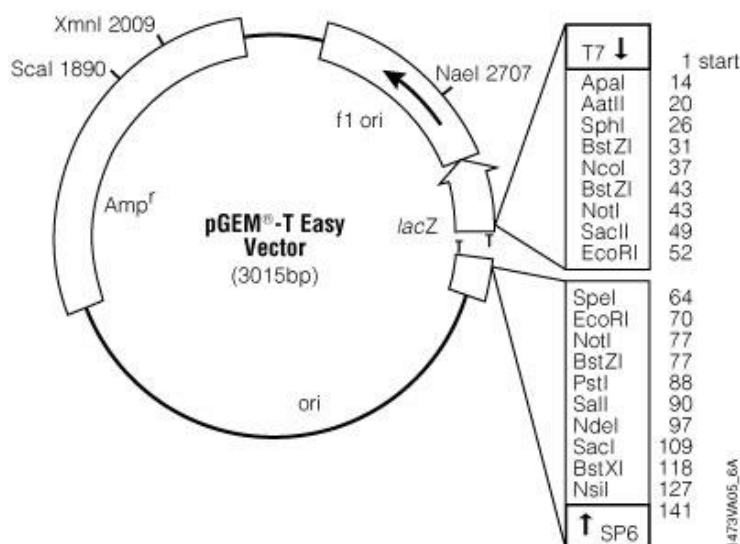
ThermoFisher Scientific), 0,4 μM BoxI reverse primer, 2 mM MgCl_2 (ThermoFisher Scientific), 0,2 mM dNTP (ThermoFisher Scientific), 1 U Taq-polimeráz (ThermoFisher Scientific) and 4 μl templát (adapter kapcsolt DNS-fragment). A reakció hőprofilja a következő volt: a kezdeti denaturáció 94 °C-on 2 percig, majd 35 ciklusban ismétlődve 94°C-on 20 másodpercig, 60 °C-on 30 másodpercig, 72°C-on 3 percig, a végső elongáció 72°C-on 5 perc volt (Mastercycler 5341, Eppendorf). A PCR amplifikációt agaróz gél elektroforézissel (1.5% agaróz, 1x TBE-puffer) és etídium-bromidos (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidium-Bromide, Reanal) festéssel ellenőriztük.

Ezt követte a dúsítás: a tandem repeat tartalmú DNS-szakaszok összegyűjtése. A fragmenteket 3'-biotinilált, $(\text{CA})_{10}$ ismétlődést hordozó oligonukleotiddal hibridizáltattuk. A reakcióelegy tartalmazta az adapterrel ellátott DNS fragmenteket, a 0,4 mM 3'-biotinilált, $(\text{CA})_{10}$ primert, 6x SSC oldatot, valamint 0,1 % SDS-t. A hibridizációt Thermal Cycler készülékben végeztük a következő protokoll szerint: a kezdeti denaturációt (92°C-on 5 perc) követően 70°C-ról indulva 0,2°C/másodperc sebességgel 50 °C hőmérsékletre hűtöttük a reakcióelegyet, majd ezen a hőmérsékleten tartottuk 10 percig. Ezt követően 0,1°C/másodperc sebességgel hűtöttük 15°C-ig. Végezetül a hibridizációs komplexeket sztreptavidinnel borított mágnesezhető szemcsék felületére kötöttük (Dynabeads M-270 Streptavidin, Invitrogen) (Kijas et al. 1994). Ehhez legelőször a mágneses gyöngyöket (50 μl) készítettük elő: egymást követően kétszer TE pufferben (250 μl), majd 1x Hyb Solution mosó-oldatban (250 μl) mostuk a gyöngyöket, majd végül 1x Hyb Solution mosó oldatba (150 μl) vettük fel a gyöngyöket. A mosási lépések során a mágnesezhető gyöngyöket egy mágnes segítségével gyűjtöttük össze a mikrocentrifugacső falára, így a mosó folyadékok egyszerűen cserélhetők. Az így előkészített gyöngyökhöz adtuk a biotinilált oligo – DNS komplex teljes mennyiségét. Ezt a reakcióelegyet alacsony fordulatszámon (100 rpm) rázó termosztátban szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, a sztreptavidin és a biotin közötti kémiai kötések kialakítása céljából. Ezt követően történt azoknak a molekuláknak az eliminálása, amelyek nem kapcsolódtak a gyöngyök felszínére: ezek a mosási lépések 50°C-on történtek, és minden mosási lépést kétszer végeztünk el, minden esetben 400-400 μl mosó-oldat hozzáadásával (Mosó-oldat A, B, C). Az egyes mosó-oldatok pontos összetételét a M2. Melléklet tartalmazza. A sztreptavidinnel borított mágnesezhető szemcséhez kötött hibridizációs komplex sematikus vázlatát a 6. ábra mutatja. Végezetül TLE-pufferrel (pH=8,00) 95 °C-on oldottuk le az ismétlődő GT-dinukleotidokat tartalmazó DNS-szakaszokat.



6. ábra. A sztreptavidinnel borított mágnesezhető szemcséhez kötött hibridizációs komplex sematikus vázlata.

A kiemelt egyszálú DNS fragmenteket a korábban leírt PCR segítségével alakítottuk kétszálúvá (Mastercycler 5341, Eppendorf), a linker-specifikus primerek felhasználásával. Az így kapott terméket T-vektorba ligáltuk (pGEM-T Easy Vector Sytem I, Promega, 7. ábra) a 9. táblázatban leírtak szerint, majd *Escherichia coli* kompetens sejtbe (XL10 GOLD, Stratagene) transzformáltuk.



7. ábra. A könyvtárkészítéshez használt T-vektor felépítése (pGEM-T Easy Vector System I, Promega).

9. táblázat. A dúsítást követő PCR reakció során kétszálúvá amplifikált terméket T-vektorba építettük a következő reakció szerint:

PCR termék	3 µl
pGEM-T Easy Vector System I.	5 ng/µl
T4 DNS Ligáz	0,1 U/µl
Rapid-puffer	1x

Az inkubáció 16°C-on, egy éjszakán keresztül történt.

A transzformálást a sejtek jégen végzett kiolvasztásával kezdtük, majd 2-2 µl ligátumot mértünk 250-250 µl XL10 Gold *Escherichia coli* kompetens sejthez. (Az eredeti protokoll TOPO klónozó rendszert használt TOP10 kompetens sejtbe transzformálva a plazmidokat, azonban mi pGEM-T Easy (Vector System I). vektort és XL10 Gold kompetens sejtet alkalmaztunk. A két vektorkonstrukció, valamint a kompetens sejtek ugyanazon az elven működnek: a vektorok esetén az egy bázisnyi túlnyúló timin „ragadós” vég, a kompetens sejtek esetén a kék-fehér szelekción biztosító gének jelenléte volt meghatározó, azaz lényegi eltérés nem történt). A sejtfal szerkezetét hőszökkel tettük átjárhatóvá (30 perc jégen, 45 másodperc 42°C-on, majd 2 perc ismét jégen). A sejteket 500 µl LB-tápleves hozzáadását követően 1 órán át 37°C-os rázótermosztátban növesztettük. A szélesztést mintánként 3 hígítási lépcsőben (10 µl sejtuszpenzió / lemez, 100 µl sejtuszpenzió / lemez, 300 µl sejtuszpenzió / lemez) 1,43 mM Ampicillin-, 0,09 mM X-gal-, 0,08 mM IPTG-tartalmú LB-táplemezekon végeztük.

A telepeket kék-fehér szelekció alapján szűrtük (Ullmann et al. 1967). Fehér színű telepek nőttek azokból a sejtekből, amelyek olyan vektort hordoztak, amelyekbe beépült az inszert. Az inszertek méretét a T-vektoron kódolt M13 primerkötő helyekről induló kolónia PCR reakciót követő agaróz gél elektroforézissel (1.5%, 1x TBE puffer) ellenőriztük. A reakciót 25 µl végtérfogatban végeztük a következő összetétel szerint: 1x Taq-polimeráz puffer (ThermoFisher Scientific), 0,26 µM – 0,26 µM M13 forward és reverse primer (F: 5' TGTAACGACGGCCAGT 3'; R: 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'), 2,00 mM MgCl₂ (ThermoFisher Scientific), 0,2 mM dNTP (ThermoFisher Scientific), 1 U Taq-polimeráz (ThermoFisher Scientific) és templátként egy-egy baktérium telep néhány sejtjét használtuk. A reakció hőmérsékleti profilja: 3x –(95°C 2 perc, 55°C 1 perc, 72°C 2 perc), majd 41x –(95°C 30 másodperc, 55°C 30 másodperc, 72°C 45 másodperc), a végső lánchosszabbítás 72°C-on 5 percig zajlott.

3.4 Szekvencia meghatározás és primer tervezés

A kolónia PCR reakció kiértékelését követően azokat termékeket tisztítottuk meg PCR Advanced Clean Up System segítségével (Viogene), amelyek >300 bp méretükkel jelezték a vektorba épülést. A tisztított PCR termékekről SP6- (5' CATACGATTTAGGTGACACTATAG 3'), valamint T7- (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') primereket alkalmazva 3.1-es BigDye kittel

(Applied Biosystems) kapilláris gélelektroforézissel meghatároztuk az inszertek bázissorrendjét (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). A szekvencia meghatározás reakció-összetételét a 10. táblázat mutatja be.

10. táblázat. Az inszert bázissorrendjének meghatározásának reakciókörülményei.

Összetétel	Hőprofil	
1 x BigDye puffer	96°C 10 másodperc	28x
0,33 µM T7 vagy SP6 primer	50°C 5 másodperc	
1 µl BigDye	60°C 4 perc	
4-7 µl tisztított PCR termék	4°C	tárolási hőmérséklet

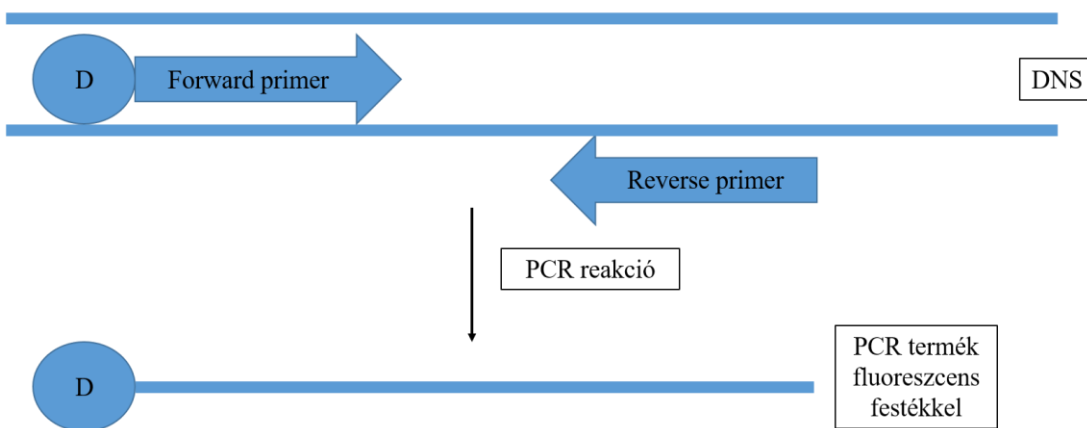
A szekvenáló reakció összetéréhez hozzáadtunk 80 µl nátrium-acetát tartalmú oldatot (112,5 mM nátrium-acetát, 78% etanol), majd alapos összekeverés és 10 percig tartó szobahőmérsékleten végzett inkubációt követően 25 percen keresztül 4°C-on 2500 g erővel centrifugáltuk a mintákat. A felülúszót eltávolítottuk, a csapadékot 70%-os etanollal mostuk, majd ismét 25 percen keresztül 4°C-on 2500 g erővel centrifugáltuk a mintákat. A felülúszó eltávolítása után szárítottuk a csapadékot, majd denaturáló hatású HiDi-Formamide-ba (Applied Biosystems) oldottuk vissza (Glenn és Schable az egyes DNS-szakaszok szekvenciájának meghatározását megelőző PCR termékek tisztítását az egyes maradék - a szekvenálási reakciót zavaró - komponensek enzimikus lebontásával végezték el - Sap, ExoI -, míg kutató csoportunk a maradék - fel nem használt - PCR összetevők kémiai eltávolításán alapuló tisztítási módszert választotta). A mintáinkat legkevesebb 10 órás inkubációt követően 96°C-on hő denaturáltuk, majd kapilláris gél elektroforézissel vizsgáltuk. A detektálás a lézerrel megvilágított fluoreszcens festék emissziója alapján történt. A szekvenciákat MEGA5 szoftverrel értékeltük (Tamura et al. 2011). A legalább 5 dinukleotid tandem ismétlődést tartalmazó szekvenciák flanking régióira Primer3Plus szoftverrel specifikus primereket terveztünk (Rozen & Skaletsky 2000; Untergasser et al. 2007), majd meghatároztuk működési körülményüket (a markerek kimutatására alkalmazott PCR-reakció összetételét és optimális hőmérsékleti profilját).

3.5 Reakciókörülmények optimalizálása

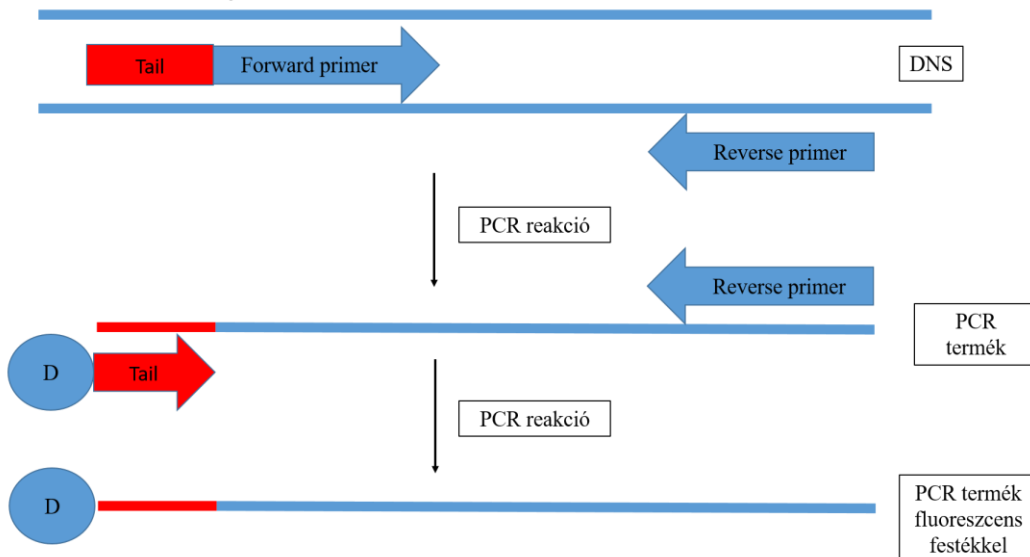
A mikroszatellit markerek kimutatása polimeráz láncreakcióval történt. A reakciókörülmények optimalizálása során pontosan meghatároztuk a reakció összetételét és hőmérsékleti profilját. A reakciót 25 µl végtérfogatban végeztük. 1x Taq-polimeráz puffer (KCl vagy (NH₄)₂SO₄-tartalmú, ThermoFisher Scientific), 0,132 mM-0,264 mM forward és reverse primer, 1,5-3,00 mM MgCl₂ (ThermoFisher Scientific), 0,2 mM dNTP (ThermoFisher Scientific), 0,04 U/µl Taq-polimeráz (ThermoFisher Scientific) és 150 ng templát DNS. A reakció hőprofilja: 2 percig 95°C-on, majd 2x –(95°C 15 másodperc, 52-56°C 1 perc, 72°C 2 perc), ezt követően 35 / 45x –(95°C 15 másodperc, 52-56°C 20 másodperc, 72°C 40 másodperc), végül 72°C-on 5 perc. A reakció markerenként változó paramétereit (primer szekvencia, polimeráz puffer, primerkoncentráció, MgCl₂-koncentráció, primer kapcsolódás

hőmérséklete, ciklusszám) az M3. Melléklet tartalmazza. A következő markerek kimutatásához DMSO (4 térfogat%) hozzáadása is javasolt: *MS 350 Cg*, *MS 432 Pf*, *MS 441 Pf*, *MS 455 Pf*, *MS 716 Pf*. Az amplikon 5' végére – a bázispár pontosságú méret-meghatározásához – fluoreszcens jelölést építettük be. Ezt a következő módokon végeztük: A) esetben a PCR reakcióban alkalmazott forward primerek hordoztak 5' FAM fluoreszcens jelölést (direkt jelölt primer), B) esetben a forward primert hosszabbítottuk meg egy 17 bp hosszúságú, a vizsgált fajra nem specifikus szakasszal (tail; 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), amellyel komplementer egy harmadik, 5' végén fluoreszcens festékkel (PET, FAM, VIC vagy NED) jelölt primer (tail primer) ([Shimizu et al. 2002](#)). A PCR reakció során az amplikonok végére épül a jelölést hordozó oligonukleotid (8. ábra).

A) A PCR-termék fluoreszcens jelölése közvetlen módszerrel



B) A PCR-termék fluoreszcens jelölése közvetett módon



8. ábra. A PCR-termék végére kapcsolt fluoreszcens festék (D) beépítésének módjai.

A) A fluoreszcens festék a marker kimutatásához alkalmazott forward primer 5' végén található (ebben az esetben kizárólag FAM fluoreszcens festéket használtunk).

B) A specifikus szakasz felszorzásában alkalmazott forward primer egy univerzális 17 bp hosszúságú ún. tail szekvenciát hordoz. A reakcióban résztvevő harmadik primer maga a tail szekvenciát hordozó oligonukleotid, melynek 5' vége hordozza a fluoreszcens festéket (PET, NED, FAM vagy VIC).

3.6 Mikroszatellit analízis

Mindhárom faj esetén az optimalizált reakciók lehetővé tették, hogy a markerek működőképességének ellenőrzéséhez és marker jellemzéshez alacsonyabb mintaszámon (8-8 egyed), majd populációgenetikai vizsgálathoz magasabb mintaszámon végezzük el a PCR reakciókat. Süllő esetén 10 populáció populációgenetikai diverzitás becslését végeztük el, összesen 376 egyed. Sügér esetén 2 magyar állomány és 1 lengyel populáció genetikai összehasonlító analízisét valósítottuk meg, összesen 182 egyeddel. Az afrikai harcsa mikroszatellit alapú genetikai jellemzését 32 egyeddel végeztük el. A reakciók sikerességét 2,5-3 % agaróz géll elektroforézissel ellenőriztük, majd a sikeres reakciókat előkészítettük fragmentanalízisre (11. táblázat), mely vizsgálatot 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) segítségével végeztük el.

11. táblázat. A minták előkészítése fragmentanalízisre.

PCR-termék (FAM/NED/PET vagy VIC fluoreszcens festékkel jelölve)	0,2-0,5 µl (PCR reakció erősségétől függően)
GeneScan 500 LIZ molekulásúly marker (Applied Biosystems)	0,1 µl
HiDi Formamide (Applied Biosystems)	9,9 µl

Denaturáció 94°C-on 6 percig, amelyet Thermal Cycler (Applied Biosystems) készülékben végeztük.

A fragmentanalízis nyers adatai alapján a bázispár pontosságú fragment méreteket **GENEMAPPER SOFTWARE VER. 4.0** (Applied Biosystems) program segítségével olvastuk le, az értékeket **EXCEL** (Microsoft) programmal készítettük elő a populáció genetikai számításokhoz.

3.7 Populációgenetikai-, valamint markerek-jellemzéshez alkalmazott szoftverek

A fragmentanalízissel megállapított allélméret szolgál alapul a populációgenetikai mutatók számításához. Meghatároztuk a populációnkénti várt (H_E) és a megfigyelt (H_o) heterozigotizáció értékeit, valamint a lókuszonkénti PIC-értéket (Polimorf Információs Tartalom) az **EXCEL MICROSATELLITE TOOLKIT VER. 3.1.1** (Park 2001) segítségével. **F_{STAT} VER. 2.9.3.2** (Goudet 1995) programmal számoltunk a markerek allélgazdagságát (A_r), a populációk F_{IS} -értékeit (a genetikai variancia populáción belüli komponense), valamint az F_{ST} -értéket (a genetikai variancia populációk közötti komponense), továbbá a géndiverzitást és az összállélszámot lókuszonként és populációnként. A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést **GENPOP VER. 4.1.0** (Rousset 2008) programmal állapítottuk meg. A populációnkénti és lókuszonkénti átlagos allélszámot, az átlagos géndiverzitást, valamint a populációpáronkénti F_{ST} értékeket az **ARLEQUIN VER. 3.5** (Excoffier et al. 2005) szoftverrel számoltuk. Az egyedi allélok meghatározását, valamint a PCoA (Principal Coordinate) analízist a **GENALEX VER. 6.502** (Peakall & Smouse 2012; Smouse et al. 2015) programmal végeztük el. A Nei-féle genetikai távolság (Nei et al. 1983) meghatározásához a **POPULATIONS VER. 1.2.32**

([Langella 2002](#)), valamint a törzsfá szerkesztéshez süllő esetén a **FIGTREE VER. 1.3.1** ([Rambaut 2009](#)), sügér esetén a **MEGA7 VER. 7.0.14** ([Kumar et al. 2016](#)) szoftvereket alkalmaztuk. Az egyedek mikroszatellit analízis eredménye alapján a vizsgált állomány szerkezetét (populációs információk felhasználása nélkül) a **STRUCTURE VER. 2.3.3** ([Hubisz et al. 2009](#); [Pritchard et al. 2000](#)) programmal állapítottuk meg. Süllő esetén a szoftver a következő beállítási paraméterekkel futott: Length of Burnin Period: 55000; Number of MCMC Reps after Burnin: 555000, A lehetséges klaszter megoszlást K=1 és K=11 között vizsgáltuk. Sügér esetén Length of Burnin Period: 50000; Number of MCMC Reps after Burnin: 200000, a lehetséges klaszter megoszlást K=1 és K=8 között vizsgáltuk. A legvalószínűbb genetikai klaszter számát az egyes K-értékek valószínűségi analízise alapján határoztuk meg ($L'(K)$, $L''(K)$ és ΔK) **STRUCTURE HARVESTER** ([Evanno et al. 2005](#); [Earl & vonHoldt 2012](#)) segítségével. A populációgenetikai analízisben alkalmazott markerek estén **GENETIX VER. 4.05.2** ([Belkhir et al. 1999](#)) szoftverrel vizsgáltuk a kiegyensúlyozatlan kapcsoltságot (LD: linkage disequilibrium). A null-allél jelenlétének, az allél kiesésnek, továbbá a genotipizálási hibáknak a valószínűségét **MICRO-CHECKER VER. 2.2.3** ([van Oosterhout et al. 2004](#)) szoftverrel állapítottuk meg. **MICROSOFT EXCEL** program segítségével kerestük, hogy van-e kapcsolat az ivar és a genotípus között azaz, hogy vajon valamely marker ivarhoz köthető-e (süllő és sügér vizsgálatokban). Az effektív populációméretet **LDNE VER. 1.31** szoftverrel határoztuk meg ([Waples & Do 2008](#)).

3.8 A fejlesztett mikroszatellitek PCR alapú kimutatásának multiplexálása

A kimutatás módszerét tovább fejlesztettük abból a célból, hogy csökkentsük az analízis (PCR alapú kimutatás és fragmentanalízis) idő- és a felhasznált anyagok költségét, valamint a laboratóriumi munkát. Ezért az újonnan izolált süllő mikrosatellitekből kiválasztottunk 16, magas allélszámmal rendelkező markert, amelyek a reakciókörülményeket (PCR összetétel és hőprofil) illetően megegyeznek. Kialakítottunk 4 különböző marker-szettet, szettenként 4, allélméretük tekintetében jól elkülönülő mikrosatellittel, melyeket az M4. Mellékletben mutatunk be (A szett, B szett, C szett, D szett). A markerek forward és reverse primer-szekvenciáit az M3. Melléklet tartalmazza. Az egyes szettek PCR reakcióinak összetételét és az alkalmazott „touch down” hőmérsékleti profilját az M5. Melléklet tartalmazza (M5.1 és M5.2). Szettenként eltérő fluoreszcens jelölést alkalmaztunk (PET, NED, FAM, VIC), így a fragmentanalízis előkészítésekor az azonos egyedből származó minták együttesen vizsgálhatóak (a minták „pool”-ozhatóak). A fragmentek méretét GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) molekulásúly markerekhez viszonyítva 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) segítségével határoztuk meg. A minták fragmentanalízis vizsgálatra való előkészítését a 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat. A multiplex PCR amplikonjai előkészítése fragmentanalízisre.

GeneScan 500 LIZ molekulasúly marker (Applied Biosystems)	0,1 µl
HiDi Formamide (Applied Biosystems)	9,9 µl
A-szett multiplex PCR amplikon (PET-jelöléssel)	0,3 µl
B-szett multiplex PCR amplikon (NED-jelöléssel)	0,3 µl
C-szett multiplex PCR amplikon (FAM-jelöléssel)	0,3 µl
D-szett multiplex PCR amplikon (VIC-jelöléssel)	0,3 µl

Denaturáció 94°C-on 6 percig, amelyet Thermal Cycler (Applied Biosystems) készülékben végeztünk.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Süllő (*Sander lucioperca*)

4.1.1 Könyvtárkészítés

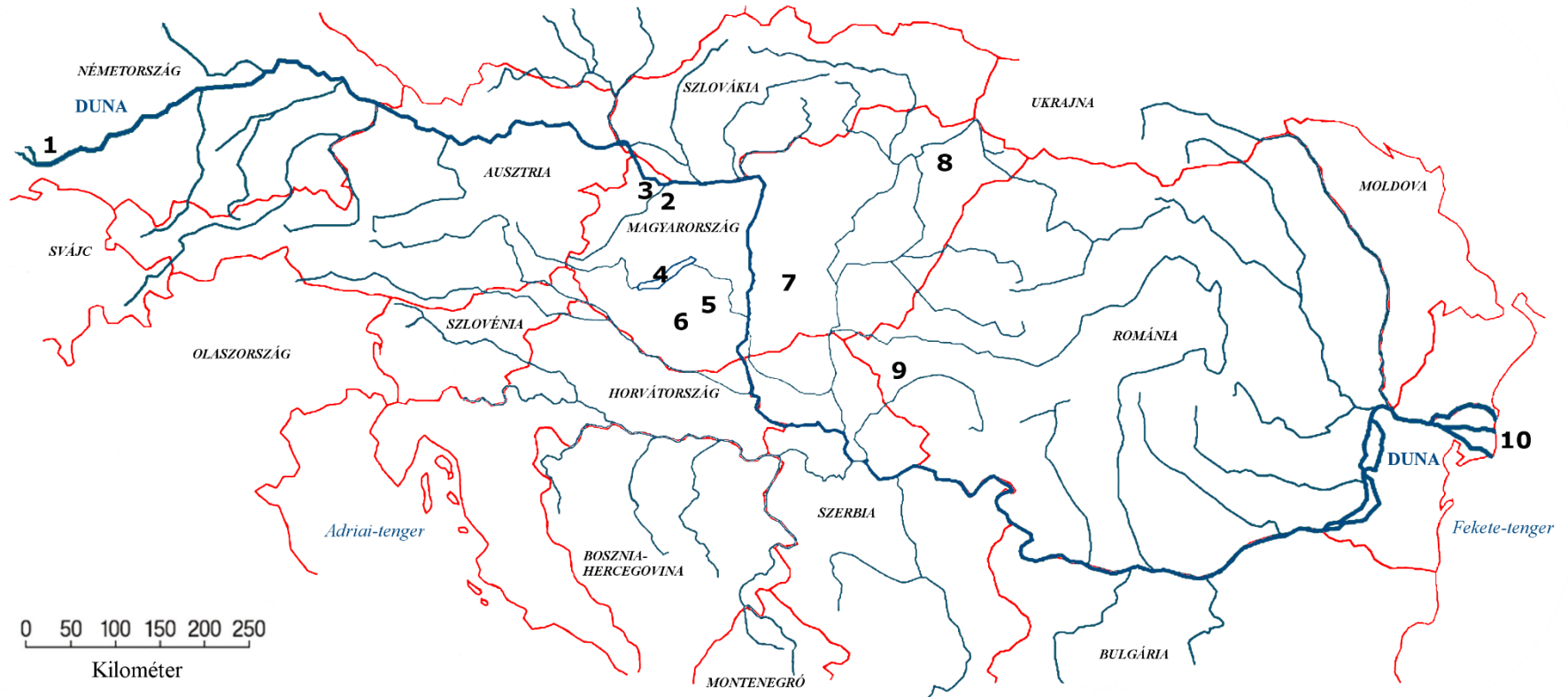
A süllő genomi DNS-éből kétféle restriktációs enzim használatával (*Rsa I*, *HpyCH4 V*) két CA-dinukleotid ismétlődésekben dúsított könyvtárat hoztunk létre. A könyvtárakból összesen 208 klónt vizsgáltunk a T-vektor M13 primerköti helyeiről induló kolónia PCR reakcióval. 115 esetben tapasztaltuk azt, hogy a bejuttatni kívánt inszert DNS beépült a vektorba. Ezeknek meghatároztuk a DNS szekvenciáját. 109 egyedi szekvencia közül 101 hordozott mikroszatellitekre jellemző ismétlődéseket, mely azt mutatja, hogy a dúsítás igen hatékonynak bizonyult. A kapott szekvenciák 93%-ban hordoztak mikroszatellitekre jellemző régiót. Az általunk meghatározott szekvenciákat génbank (NCBI GenBank) adatbázisba helyeztük, a génbanki azonosítókat az M6. Melléklet tartalmazza. Ezek közül 34 esetben sikerült működőképes markert fejleszteni. A markerek működőképességét legalább 8 egyeden teszteltük, majd jellemzőit meghatároztuk.

4.1.2 Az újonnan fejlesztett markerek jellemzése

A 34 működőképes marker mind polimorfnek bizonyult, a detektált allélok száma 3-20 között alakultak lókuszonként (M6. Melléklet). A legtöbb allélt (20) az *MS 260 Sl* markerrel tudtuk detektálni, de magas a polimorfítása az *MS 84 Sl*, *MS 192 Sl*, *MS 412 Sl*, valamint az *MS 424 Sl* markereknek is. Megjegyzendő, hogy az *MS 412 Sl* és az *MS 424 Sl* mikroszatellitek, csupán 8 egyed tesztelésével is 10-10 allélt reprezentáltak. A klónozott mikrosatellit ismétlődést tartalmazó régiójának szekvenciáját és várt méretét, a detektált allélok számát és mérettartományukat, továbbá a lókuszonkénti várt és megfigyelt heterozigotizációnkat, ezek különbségének szignifikanciáját, valamint a markerek PIC értékét a vizsgált egyedszám függvényében az M6. Melléklet tartalmazza.

4.1.3 Populációgenetikai analízis

A kifejlesztett markerek közül 7 markert (*MS 192 Sl*, *MS 195 Sl*, *MS 198 Sl*, *MS 203 Sl*, *MS 260 Sl*, *MS 268 Sl*, *MS 397 Sl*) alkalmaztunk 10, a Duna vízgyűjtő területéről származó populáció / állomány (Ak: Akasztó; At: Attala; Gy: Győr; Ti: Temesvár; Kb: Kisbajcs; Ny: Nyíregyháza; Da: Dalmand; Ba: Balaton; De: Duna-delta torkolat; Ge: Duna felső szakasza) diverzitás vizsgálatára. A mintavételi helyszínek térképes ábrázolását a 9. ábra, a mintavételi helyeket, a vizsgált állományok típusát, valamint a vizsgált egyedszámokat a 4. táblázat tartalmazza.



9. ábra. A süllő (*Sander lucioperca*) populáció genetikai analizésébe bevont populációk és állományok származása. 1: Németország (Duna felső szakasza, Ge); Magyarország: 2: Győr (Gy), 3: Kisbajcs (Kb), 4: Balaton (Ba), 5: Dalmand (Da), 6: Attala, (At), 7: Akasztó (Ak), 8: Nyíregyháza (Ny); Románia: 9: Temesvár (Ti), 10: Duna-delta torkolat (De)

A kiválasztott markerek közül a legtöbb különböző allélt (17; 20), a legmagasabb átlagos allélszámot (7; 6,7) és allélgazdagságot (10,226; 8,661) az *MS 192 SI*, valamint az *MS 260 SI* markerekkel detektáltuk, azonban az átlagos összallélszám (9,14) is magas volt. A legmagasabb átlagos allélszámmal meglepő módon a mesterségesen kialakított kisbajcsi (Kb: 5,43) és dalmandi (Da: 4,71) állományok rendelkeznek (13. táblázat), ez nagy valószínűséggel annak köszönhető, hogy az állomány kialakításához több helyről és több időpontban szereztek be egyedeket. Ha a vizsgált populáció méretét is figyelembe vesszük, akkor az allélgazdagság (A_r) értékek alapján az allélokban leggazdagabb populációk közé a Duna-Deltából származó (De) populáció is besorolható (13. táblázat).

A várt (H_E) heterozigotitás értékek 0,452-0,593 között, a megfigyelt (H_o) heterozigotitás értékek 0,415-0,567 között alakultak, a P-érték a köztük meglévő különbség szignifikanciáját mutatja be. Csúpan 2 populációnál nem mutatható ki szignifikáns különbség: a temesvári (Ti) és a német (Ge) csoportokon belül fennáll a Hardy-Weinberg egyensúly. A legmagasabb átlagos géndiverzitás a Duna-delta torkolati (De) és az attalai (At) populációknál figyelhető meg (13. táblázat). A populációk többségénél kismértékű heterozigóta-hiány figyelhető meg, de a kisbajcsi (Kb) állománynál kismértékű heterozigóta-többlet van ($F_{IS} = -0,038$). Az effektív populációméret ideális esetben kisebb a populáció tényleges méreténél (Nei & Tajima 1981). Az általunk vizsgált állományok esetében ez meg is valósult az attalai (At), a győri (Gy), a kisbajcsi (Kb), a dalmandi (Da) és a balatoni (Ba) közösségekben.

13. Táblázat. Az analízis populációkra vonatkozó eredményei.

Állomá- nyok	Átlagos allél- szám	A_r	H_E	H_o	HWE	Átlagos géndi- verzitás	F_{IS}	Ne (95% CI.)
<i>Ak</i>	4,14	3,816	0,518	0,438	*	0,508	0,157	95,5 (136-∞)
<i>At</i>	3,71	3,501	0,525	0,491	*	0,520	0,066	19,6 (6,6-1642,5)
<i>Gy</i>	4,29	3,769	0,454	0,415	***	0,454	0,087	13,2 (4,8-53,9)
<i>Ti</i>	2,57	2,481	0,452	0,442	ns	0,449	0,024	-23,8 (17,8-∞)
<i>Kb</i>	5,43	3,975	0,500	0,519	***	0,492	-0,038	29,7 (17,5-54,1)
<i>Ny</i>	3,86	3,273	0,466	0,458	*	0,461	0,018	150,1 (29,4-∞)
<i>Da</i>	4,71	3,644	0,492	0,422	*	0,492	0,142	6,8 (3,2-12,8)
<i>Ba</i>	4,57	3,494	0,462	0,450	*	0,462	0,025	42,3 (20,8-125,9)
<i>De</i>	4,29	3,968	0,593	0,567	*	0,629	0,046	-146,0 (128,0-∞)
<i>Ge</i>	3,29	3,254	0,560	0,498	ns	0,484	0,024	55,7 (4,9-∞)
Összes	4,09	5,320	0,615	0,478	***			

Átlagos allélszám populációnként. A_r : allélgazdagság. H_E : várt heterozigotitás. H_o : megfigyelt heterozigotitás. HWE: Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés szignifikanciája; ns: nem szignifikáns a különbség; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ a különbség szignifikáns. Átlagos géndiverzitás. F_{IS} : populáción belüli variancia komponens. Ne: Effektív populációméret (CI: konfidencia limit) (Ak: Akasztó; At: Attala; Gy: Győr; Ti: Temesvár; Kb: Kisbajcs; Ny: Nyíregyháza; Da: Dalmand; Ba: Balaton; De: Duna-delta torkolat; Ge: Duna felső szakasza)

A populációk vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált csoportok hordoznak egyedi jellegzetességeket is. A legtöbb (4) egyedi allélt a Duna-delta torkolatából (De) származó csoportnál észleltünk, de a kisbajcsi (Kb) és a győri (Gy) állományok is hordoznak 3-3 egyedi allélt. Az *MS 260 Sl* marker 9 egyedi alléllal rendelkezik, a soron következő *MS 397 Sl* marker már csupán 3-mal (14. táblázat). Az egyedi allélok a frekvenciája igen alacsony, azonban az *MS 260 Sl* marker esetén az egyedi allélok előfordulásának gyakorisága 15% a németországi populációban (Ge).

14. Táblázat. A süllő populáció genetikai analízise során detektált egyedi (populációra jellemző) alléljainak száma.

Mikroszatellit marker	<i>Ak</i>	<i>At</i>	<i>Gy</i>	<i>Ti</i>	<i>Kb</i>	<i>Ny</i>	<i>Da</i>	<i>Ba</i>	<i>De</i>	<i>Ge</i>	Összes
<i>MS 192 Sl</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>MS 195 Sl</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MS 198 Sl</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MS 203 Sl</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
<i>MS 260 Sl</i>	1	0	1	0	2	0	0	0	3	2	9
<i>MS 268 Sl</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MS 397 Sl</i>	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3
Összes	1	1	3	1	3	0	0	0	4	2	

Ak: Akasztó; At: Attala; Gy: Győr; Ti: Temesvár; Kb: Kisbajcs; Ny: Nyíregyháza; Da: Dalmand; Ba: Balaton; De: Duna-delta torkolat; Ge: Duna felső szakasza

Az összes vizsgált populációra az F_{ST} -érték 0,214, mely azt tükrözi, hogy a populációk közötti genetikai differenciáltság meglehetősen magas. Az F_{ST} értékeket populáció páronként is meghatároztuk (15. táblázat), és így találtunk több olyan populáció párt is, amelyek között a genetikai differenciáltság ennél is magasabbnak bizonyult. A legnagyobb különbséget ($F_{ST}=0,3706$) a németországi (Ge) populáció és a győri (Gy) recirkulációs rendszerből származó állomány között detektáltunk, de genetikai szempontból jelentősen eltér a németországi populációtól a kisbajcsi (Kb), a nyíregyházi (Ny) és a földrajzilag legtávolabb eső temesvári (Ti) populációk is. A legcsekélyebb különbséget ($F_{ST}=0,0324$) a dalmandi (Da) és a balatoni (Ba) populációk között tapasztaltuk, ami nem meglepő, hiszen a tenyésztőtől származó információk szerint a dalmandi (Da) tógazdaság anyahalai a Balatonból származnak. Továbbá alacsony a genetikai különbözőség mesterségesen szaporított attalai (At) és akasztói (Ak) ($F_{ST}=0,0384$), valamint a kisbajcsi és a nyíregyházi ($F_{ST}=0,0737$) populációk között. A populációpárok többségére (ahol a populáció páronkénti $F_{ST} < 0,2$) elmondhatjuk, hogy a genetikai differenciáltság nem kiemelkedően magas, amiben feltételezhetően jelentős szerepe van annak, hogy korábban az intenzív és tógazdasági állományokat több különböző helyről származó anyahalakkal alakították

ki, majd ezekből végzetek visszatelepítéseket. A mesterségesen kialakított és a természetes populációk között a mai napig egy állandó kapcsolat van a telepítések és visszatelepítéseknek köszönhetően.

15. táblázat. F_{ST} értékek populáció páronként (Weir & Cockerham 1984).

Populációk	Ak	At	Gy	Ti	Kb	Ny	Da	Ba	De
At	<u>0,0384</u>								
Gy	0,0977	0,1038							
Ti	0,2104	0,2150	0,2732						
Kb	0,1956	0,2113	0,2203	0,2140					
Ny	0,2415	0,2552	0,3056	0,2412	<u>0,0737</u>				
Da	0,1141	0,0808	0,1559	0,1679	0,2042	0,2565			
Ba	0,1017	0,1171	0,1670	0,1669	0,2093	0,2629	<u>0,0324</u>		
De	0,2382	0,2492	0,2704	0,2190	0,2446	0,2331	0,2663	0,2750	
Ge	0,2710	0,2436	0,3706	0,3607	0,3442	0,3279	0,2329	0,2969	0,2788

Dőlt, aláhúzott jelölés: a legkisebb különbségeket jelöli a populációpárok között; **vastagon szedett, aláhúzott jelölés:** a legnagyobb különbségeket jelöli a populációpárok között. Ak: Akasztó; At: Attala; Gy: Győr; Ti: Temesvár; Kb: Kisbajcs; Ny: Nyíregyháza; Da: Dalmand; Ba: Balaton; De: Duna-delta torkolat; Ge: Felső-Duna

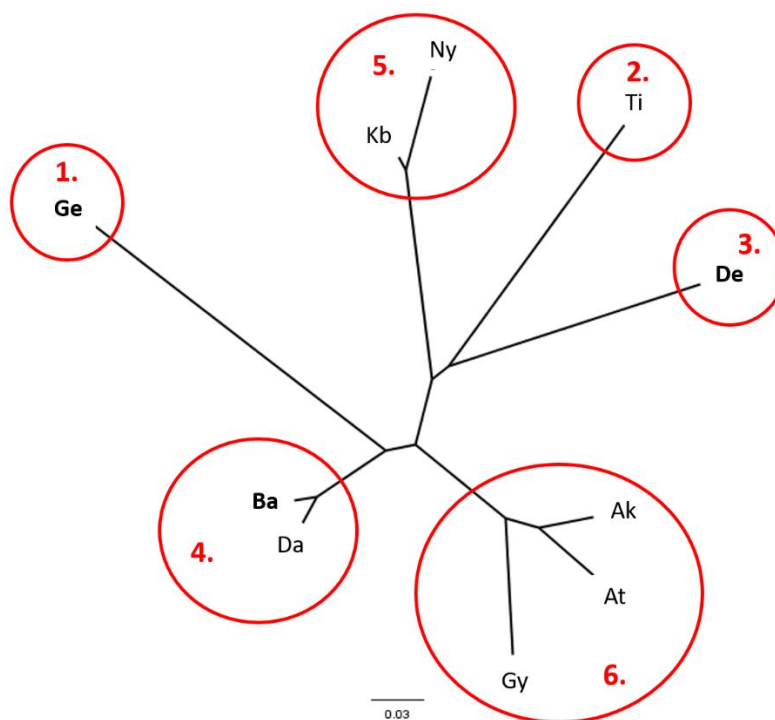
Meghatároztuk a Nei-féle genetikai távolságot (1983) (Nei-féle D_a , 16. táblázat), majd a kapott eredmény alapján a populációk közötti rokonság ábrázolására filogenetikai fát (Neighbour Joining) készítettünk (10. ábra). A legnagyobb genetikai távolságot ($D_a=0,807$) ott mértük, ahol a legnagyobb genetikai differenciáltságot is tapasztaltuk: a német (Ge) és a győri (Gy) populációk között. Továbbá nagy genetikai távolságot mértünk a temesvári (Ti) és a német ($D_a=0,758$), a kisbajcsi (Kb) és a német ($D_a=0,778$), valamint a Duna-delta torkolati (De) és a német ($D_a=0,713$) populációpárok között. A legkisebb genetikai távolságot a dalmandi-balatoni populációpárnál ($D_a=0,040$) tapasztaltuk, de hasonlóan alacsony értékeket mutatnak az akasztói-attalai ($D_a=0,073$) és a kisbajcsi-nyíregyházi ($D_a=0,085$) populációpárok.

16. táblázat. Nei-féle genetikai távolság (Da) populációpáronként.

Populációk	Ak	At	Gy	Ti	Kb	Ny	Da	Ba	De
At	<u>0,073</u>								
Gy	0,132	0,140							
Ti	0,316	0,328	0,394						
Kb	0,301	0,340	0,320	0,313					
Ny	0,373	0,413	0,488	0,333	<u>0,085</u>				
Da	0,160	0,114	0,202	0,222	0,300	0,391			
Ba	0,127	0,147	0,200	0,198	0,289	0,376	<u>0,040</u>		
De	0,529	0,591	0,566	0,420	0,481	0,419	0,566	0,536	
Ge	0,536	0,458	0,807	0,758	0,778	0,627	0,386	0,511	0,713

Dőlt, aláhúzott jelölés: a legkisebb különbségeket jelöli a populációpárok között; **vastagon szedett, aláhúzott jelölés:** a legnagyobb különbségeket jelöli a populációpárok között.

Ak: Akasztó; At: Attala; Gy: Győr; Ti: Temesvár; Kb: Kisbajcs; Ny: Nyíregyháza; Da: Dalmand; Ba: Balaton; De: Duna-delta torkolat; Ge: Felső-Duna

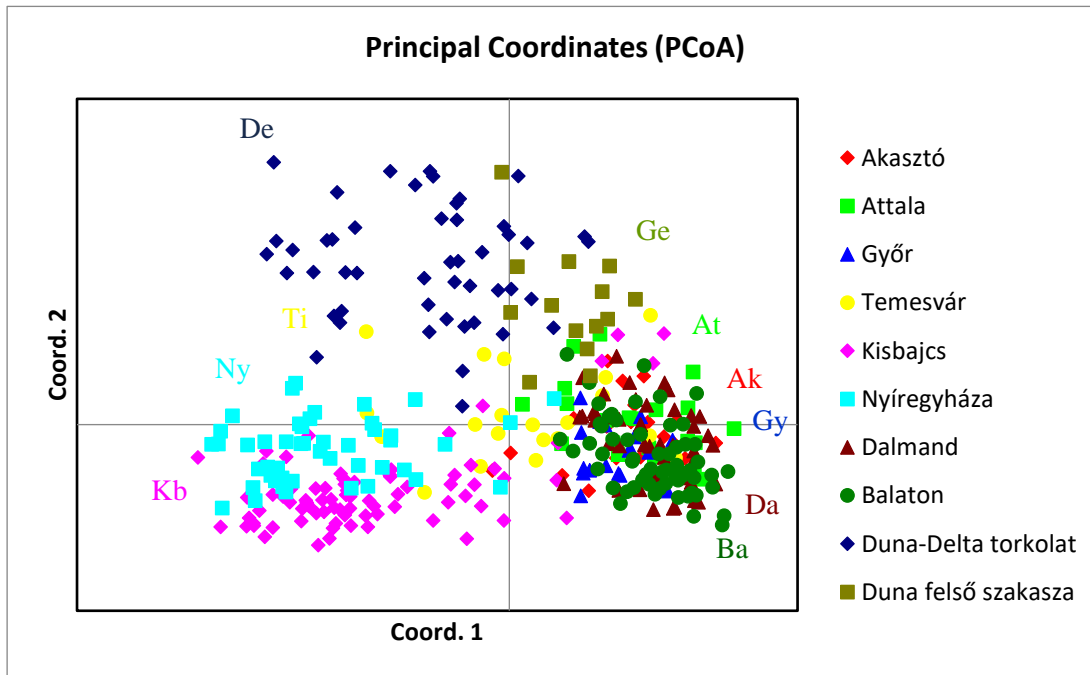


10. ábra. Nei-féle genetikai távolság alapján készített dendrogram Neighbour Joining módszer alapján.

A német (Ge, az ábrán 1. számmal jelölve), a temesvári (Ti, 2. számmal jelölve) és a Duna-delta torkolati (De, 3. számmal jelölve) önálló genetikai egységeket alkotnak, további önálló genetikai egységeket alkotnak a balatoni (Ba)-dalmandi (Da, 4. számmal jelölve); a kisbajcsi (Kb)-nyíregyházi (Ny, 5. számmal jelölve); valamint az akasztói (Ak)-attalai (At)-győri (Gy, 6. számmal jelölve) populációk. A félkövérrel jelölt populációk a természetes vízi populációk (Ge, Ba, De).

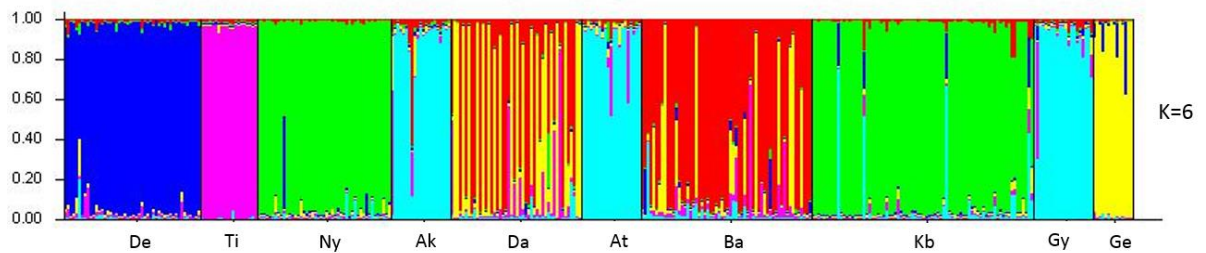
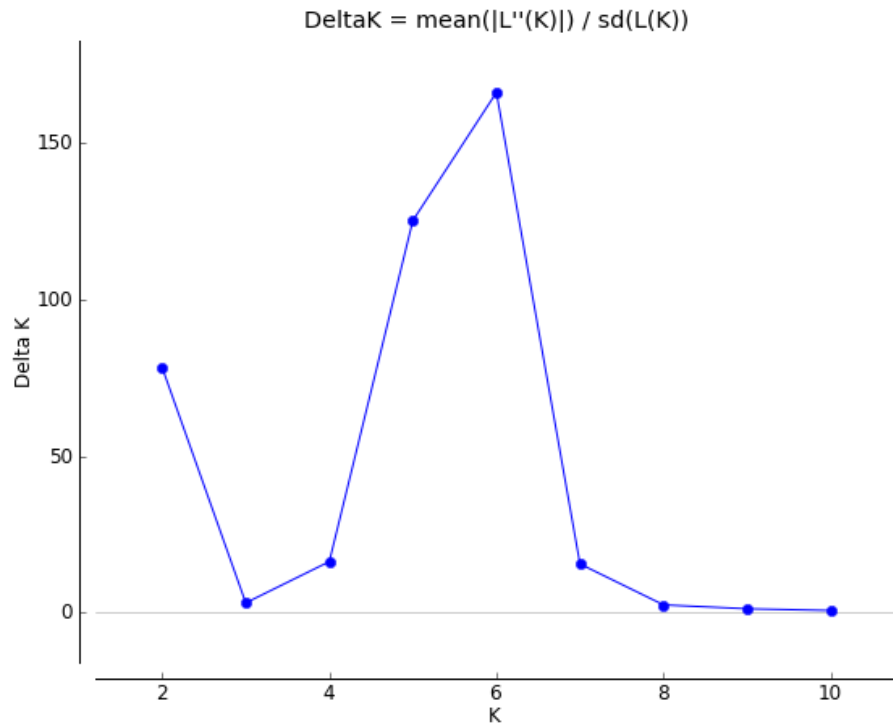
A genetikai távolság alapján PCoA (Principal Coordinate Analysis vagy főkoordináta elemzés) elemzést is végeztünk a GENALEX szoftver segítségével, melynek

eredményét a *11. ábrán* mutatjuk be. A grafikonon jól látható a Duna-delta torkolati (De), továbbá a Duna felső szakaszának (Ge), valamint a temesvári (Ti) állományok önállósága, ezen túl pedig a kisbajcsi (Kb) és nyíregyházi (Ny) csoportok hasonlósága, azonban a további állományok elkülönülése, valamint az egymáshoz viszonyított genetikai távolságuk már korántsem olyan kifejezőek, mint a *10. ábrán* látható dendrogrammon, vagy a *12. ábrán* látható STRUCTURE ábrán.



11. ábra. A süllő populációgenetikai vizsgálatának PCoA elemzése.

Az egyedek mikroszatellit analízise alapján **STRUCTURE VER. 2.3.3** ([Hubisz et al. 2009](#); [Pritchard et al. 2000](#)) szoftver segítségével meghatároztuk az állományok genetikai szerkezetét különböző számú klaszterek jelenlétét feltételezve. A **STRUCTURE HARVESTER** programcsomaggal végzett Evanno-módszer ([Evanno et al. 2005](#); [Earl & vonHoldt 2012](#)) a legvalószínűbb csoportszámnak a $K=6$ (*12.A ábra*) mutatta, azaz a 10 mintavételi helyről származó minták genetikailag 6 külön csoportba sorolhatók be (*12.B ábra*), ahogyan ezt a Nei-féle genetikai távolságok alapján megszerkesztett dendrogram is mutatja (*10. ábra*).



12. ábra. A STRUCTURE programmal meghatározott és megjelenített genetikai szerkezete a vizsgált populációknak és állományoknak.

12.A ábra. A STRUCTURE HARVESTER programmal számított DeltaK függvény, melynek x-tengelye a vizsgált klaszterszámokat jeleníti meg, y-tengelye a DeltaK értékeket.

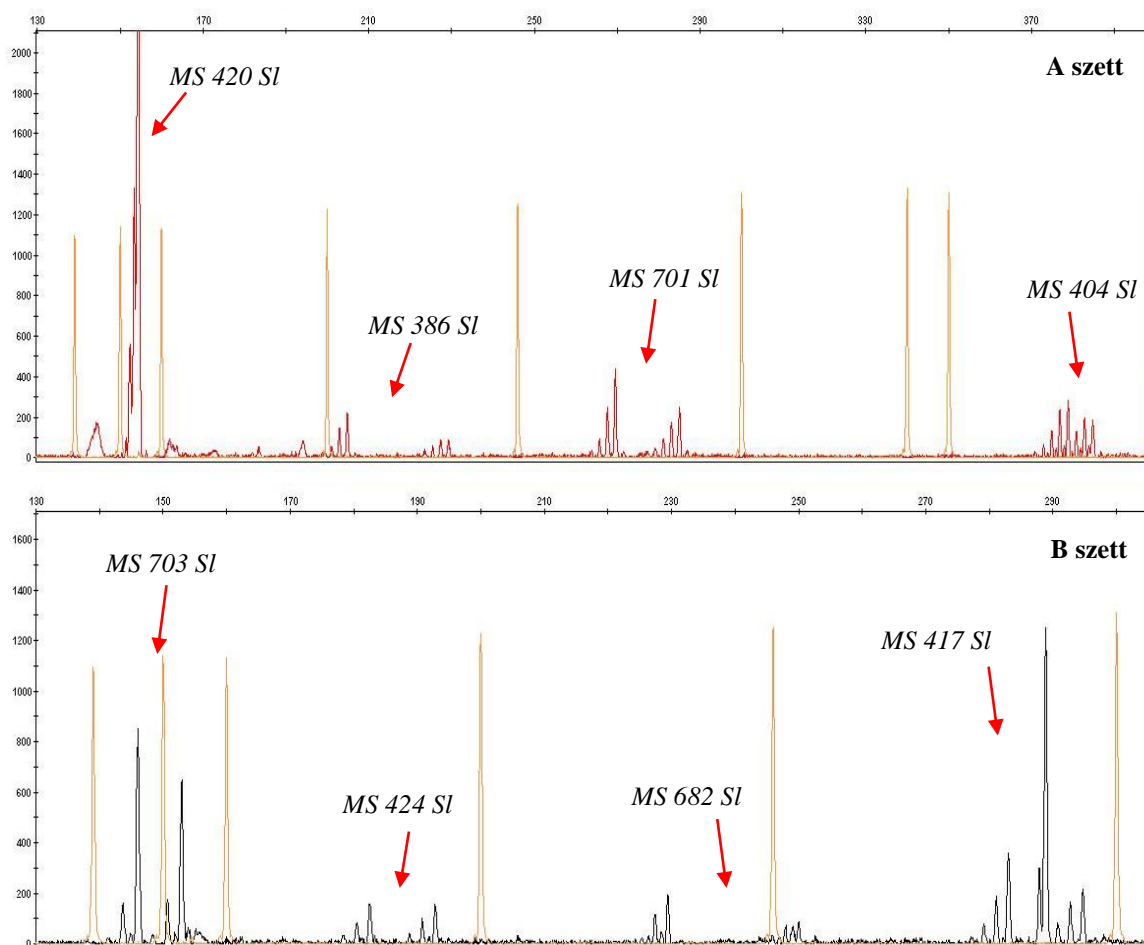
12.B ábra A STRUCTURE programmal végzett populáció szerkezet meghatározás szerint a vizsgált 10 populáció legvalószínűbb K=6 csoportra különül el genetikailag.

Ak: Akasztó; At: Attala; Gy: Győr; Ti: Temesvár; Kb: Kisbajcs; Ny: Nyíregyháza; Da: Dalmand; Ba: Balaton; De: Duna-delta torkolat; Ge: Felső-Duna

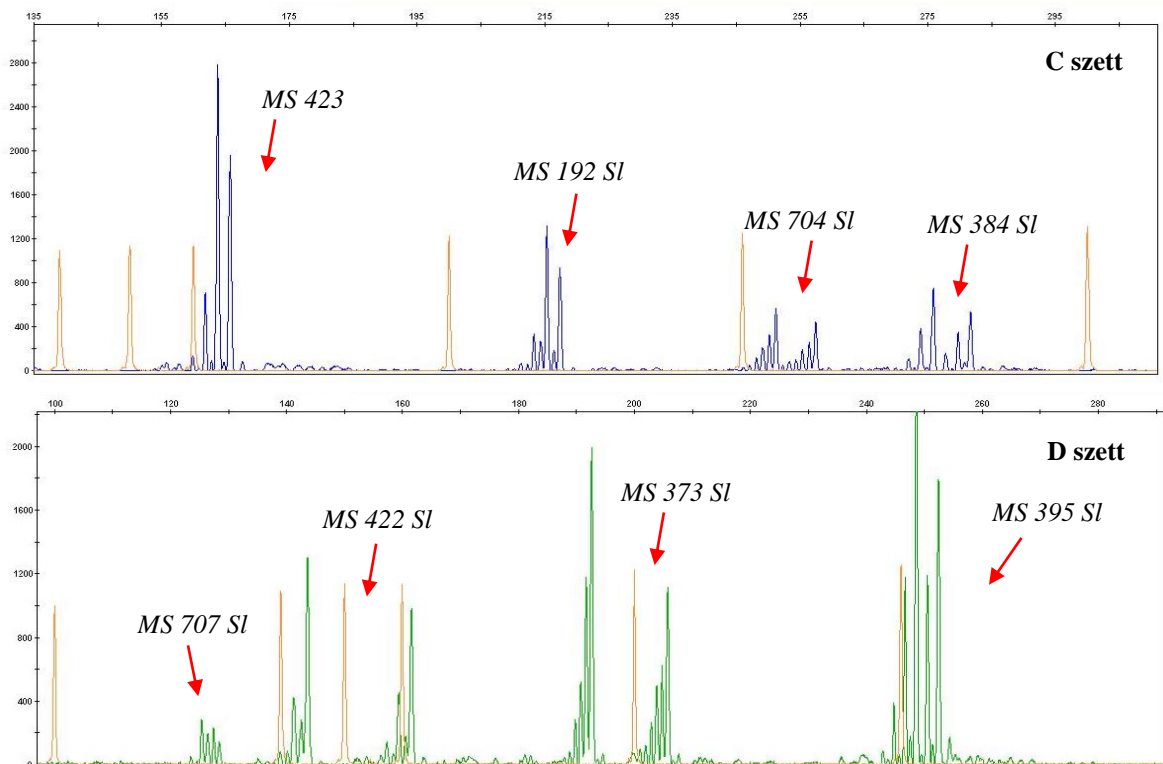
A populációgenetikai analízisben alkalmazott markerek között nem tapasztaltunk kiegyensúlyozatlan kapcsoltságot. A null-allél jelenlétének valószínűségét, az allélkiesés valószínűségét, valamint a genotipizálási hibák valószínűségét az M7. Melléklet tartalmazza. Azt is vizsgáltuk, hogy a detektált allélok kapcsoltságban állnak-e az ivarral, de ebben a tekintetben nem találtunk összefüggést, ugyanis nem találtunk olyan allélt egyik fejlesztett marker esetén sem, amely csak az egyik ivarban mutatkozott volna meg.

4.1.4 A multiplex PCR optimalizálás eredményei

Az újonnan fejlesztett süllő markerek közül 16 olyan markert választottunk ki, melyek kellően magas polimorfitásúak, azonos reakciókörülmények szükségesek a kimutatásukhoz, valamint 4 különálló szettbe csoportosíthatóak az amplifikált termékek hossza alapján. Az optimalizált reakciókat 4 tesztedyeden ellenőriztük, 1 egyed eredményét a 13. ábrán mutatjuk be (az ábra méretéből kifolyólag 2 részletben kerül bemutatásra, 13.A és 13.B ábrák). Ezzel a módszerrel közel negyedére csökkentettük a felhasznált anyagok mennyiségét, valamint a laboratóriumi munka időigényét, összességében pedig egy költséghatékony módszert fejlesztettünk ki. Egy populációgenetikai analízisben rendszerint elégséges 10-12 polimorf mikroszatellit alkalmazása, ez a módszer igen hatékony és gyors megoldást nyújt nagy mintaszámú vizsgálat esetén.



13.A ábra. Az A- és B- multiplex szettek bázispár pontosságú méret meghatározására alkalmazott fragmentanalízis eredménye egy egyedén. Piros nyilakkal és felettük az azonosítójukkal jelöltük az egyes markereket. Azok a mikroszatellitek, amelyek egy csúcs-sorozattal rendelkeznek, homozigóták, amelyek pedig 2 csúcs-sorozattal, azok heterozigóták. A narancssárga színnel jelölt csúcsok a molekulaszűz marker egyes fragmentjeit jelölik (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems).



13.B ábra. A C- és D- multiplex szettek bázispár pontosságú méret meghatározására alkalmazott fragmentanalízis eredménye egy egyeden. Piros nyilakkal és felettük az azonosítójukkal jelöltük az egyes markereket. Azok a mikroszatellitek, amelyek egy csúcs-sorozattal rendelkeznek, homozigóták, amelyek pedig 2 csúcs-sorozattal, azok heterozigóták. A narancssárga színnel jelölt csúcsok a molekulaszám marker egyes fragmentjeit jelölik (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems).

4.2 Sügér (*Perca fluviatilis*)

4.2.1 Könyvtárkészítés

A könyvtárkészítéshez izolált DNS hasításához alkalmazott restriktív enzimekkel (*Rsa I*, *HpyCH4 V*) 2-féle dúsított könyvtárat hoztunk létre. A könyvtárakból összesen 137 klónt vizsgáltunk a T-vektor kolónia PCR reakcióval. 95 esetben megfelelő méretű DNS épült be a vektorba. Ezeknek meghatároztuk a szekvenciáját. 88 egyedi szekvencia közül 82 hordozott mikroszatellitekre jellemző ismétlődéseket. Az általunk meghatározott szekvenciákat GenBank adatbázisba helyeztük (M8. Melléklet). Ezek közül 25 esetben sikerült működőképes markert fejleszteni. A markerek optimális működési körülményeit meghatároztuk és 8 kiválasztott egyeden teszteltük, majd 12 markerrel (*MS 426 Pf*, *MS 427 Pf*, *MS 428 Pf*, *MS 439 Pf*, *MS 464 Pf*, *MS 467 Pf*, *MS 500 Pf*, *MS 719 Pf*, *MS 725 Pf*, *MS 726 Pf*, *MS 732 Pf*, *MS 739 Pf*) populációgenetikai analízist végeztünk 2 hazai tógazdasági állományon összehasonlítva egy lengyelországi természetes sügér populációval (4. táblázat).

4.2.2 Az újonnan fejlesztett markerek jellemzése

A 25 működőképes marker mind polimorfnek bizonyult, a detektált allélok száma 3-48 között alakult. A legtöbb allélt (48) az *MS 428 Pf* markerrel tudtuk detektálni,

de magas a polimorfítása az *MS 427 Pf*, *MS 464 Pf*, valamint az *MS 726 Pf* markereknek is. Megjegyzendő, hogy az *MS 449 Pf* és az *MS 450 Pf* mikroszatellitek, csupán 8 egyed tesztelésével is 12-12 allélt reprezentáltak. A markerek jellemzéséhez meghatároztuk a várt (H_E) és megfigyelt (H_O) heterozigotitást, a Hardy-Weinberg Egyensúlyi állapottól való eltérést (HWE), valamint a polimorf információ tartalmát (PIC), valamint jellemeztük a populációgenetikai analízisbe bevont markerek polimorfítását jelző mutatókat (allélgazdagság, géndiverzitás, PIC) is populációnként. A markerekre vonatkozó jellegzetességeket az M8. Mellékletben összegezzük.

4.2.3 Populációgenetikai analízis

A vizsgált állományokra vonatkozó populációgenetikai jellemzőket a 17. táblázat foglalja össze. A legmagasabb átlagos allélszámmal és effektív allélszámmal a lengyelországi természetes populáció (Po-O) rendelkezik. Mindhárom populációra elmondható, hogy a heterozigotitás alacsony (heterozigóta hiányt tapasztaltunk), ezek az állományok szignifikánsan eltérnek a Hardy-Weinberg-féle egyensúlyi állapottól. Összességében viszont elmondható, hogy a populációk közötti genetikai differenciáltság jelentős ($F_{ST}=0,247$). Az effektív populációméret csupán a dunaföldvári (Hu-D) állományban tükrözi az ideális állapotot (a vizsgált állomány méret tekintetében).

17. táblázat. A vizsgált állományok populációgenetikai jellemzői

Vizsgált állományok	Vizsgált egyed-szám	Átlagos allélszám	Effektív allélszám	H_E	H_O	HWE	Géndiverzitás	F_{IS}	Ne (95% CI)
Dunaföldvár (Hu-D)	43	8,667	4,329	0,620	0,459	***	0,515	0,262	27,7 (20,2-40,0)
Biatorbágy (Hu-B)	80	9,500	4,090	0,608	0,533	***	0,605	0,123	84,6 (56,9-143,3)
Olsztyn (Po-O)	59	10,667	6,390	0,535	0,414	***	0,463	0,228	-346,3 (378,1- ∞)
Összesen	182	9,611		0,708	0,477	***			

H_E : várt heterozigotitás, H_O : megfigyelt heterozigotitás, HWE: Hardy-Weinberg Egyensúlytól való eltérés szignifikanciája: ***, ahol $P < 0,001$; F_{IS} : a populáción belüli variancia komponens jellemző index, Ne: Effektív populációméret (CI: konfidencia limit).

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

18. táblázat. A vizsgált állományokban detektált egyedi allélok száma.

Lókususz megnevezése	Hu-D	Hu-B	Po-O
<i>MS 426 Pf</i>	0	0	1
<i>MS 427 Pf</i>	3	1	21
<i>MS 428 Pf</i>	8	16	7
<i>MS 439 Pf</i>	0	0	2
<i>MS 464 Pf</i>	0	2	14
<i>MS 467 Pf</i>	0	0	1
<i>MS 500 Pf</i>	1	2	0
<i>MS 719 Pf</i>	1	1	4
<i>MS 725 Pf</i>	2	0	10
<i>MS 726 Pf</i>	0	2	18
<i>MS 732 Pf</i>	4	0	1
<i>MS 739 Pf</i>	1	3	1

Hu-D: Dunaföldvár, Hu-B: Biatorbágy, Po-O: Olsztyn; a három vizsgált állomány. A kimagaslóan magas egyedi allélszámokat félkövérrel jelöltük.

A populációkat páronként is összevetettük, a Nei-féle (1983) genetikai távolság (D_a), továbbá az F_{ST} értékek függvényében (19. és 20. táblázatok). A Nei-féle genetikai távolság egészen kicsi (0,149) a 2 magyar állomány között (ahogyan a földrajzi távolság is), azonban jóval nagyobb a 2 magyar és a lengyel állományok ($>0,6$) között. A genetikai differenciáltságot mutató F_{ST} értékek alapján is ugyannerre a következtetésre jutottunk. A Nei-féle genetikai távolság alapján szerkesztett Neighbour-Joining dendrogrammot – a legvalószínűbb genetikai kapcsolatot a vizsgált populációk között - a 14. ábra mutatja.

19. táblázat. Nei-féle genetikai távolság értékek populáció-páronként.

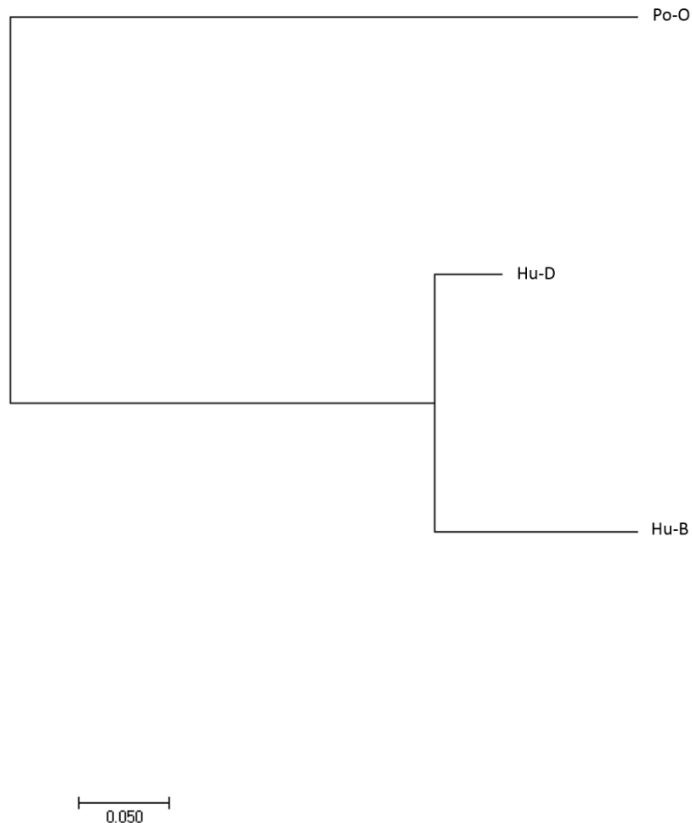
Nei-féle genetikai távolság	Hu-D	Hu-B	Po-O
Hu-D	0,000		
Hu-B	0,149	0,000	
Po-O	0,616	0,691	0,000

Hu-D: Dunaföldvár, Hu-B: Biatorbágy, Po-O: Olsztyn, a 3 vizsgált állomány

20. táblázat. Populáció-páronkénti F_{ST} -értékek.

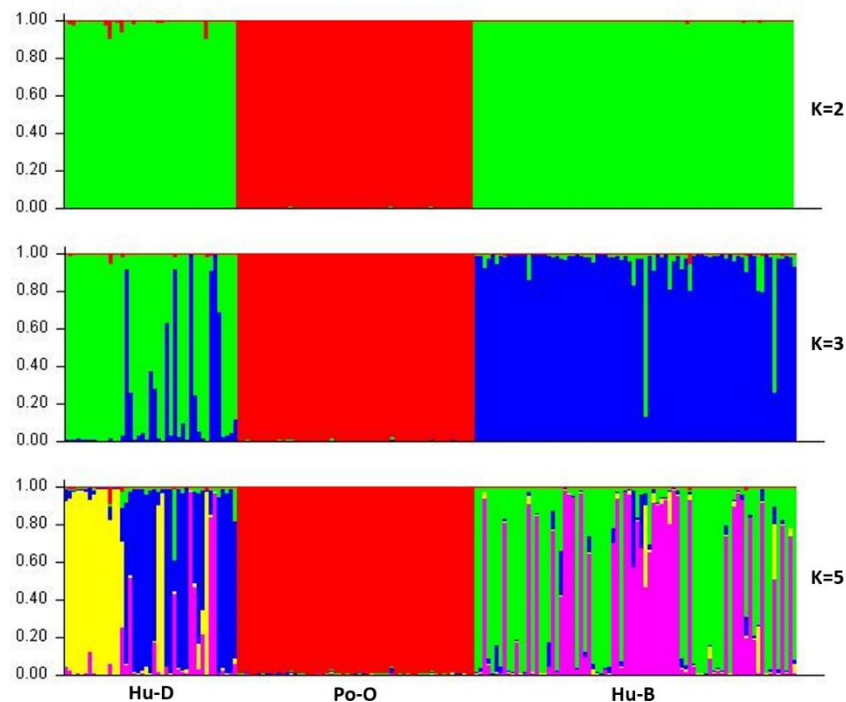
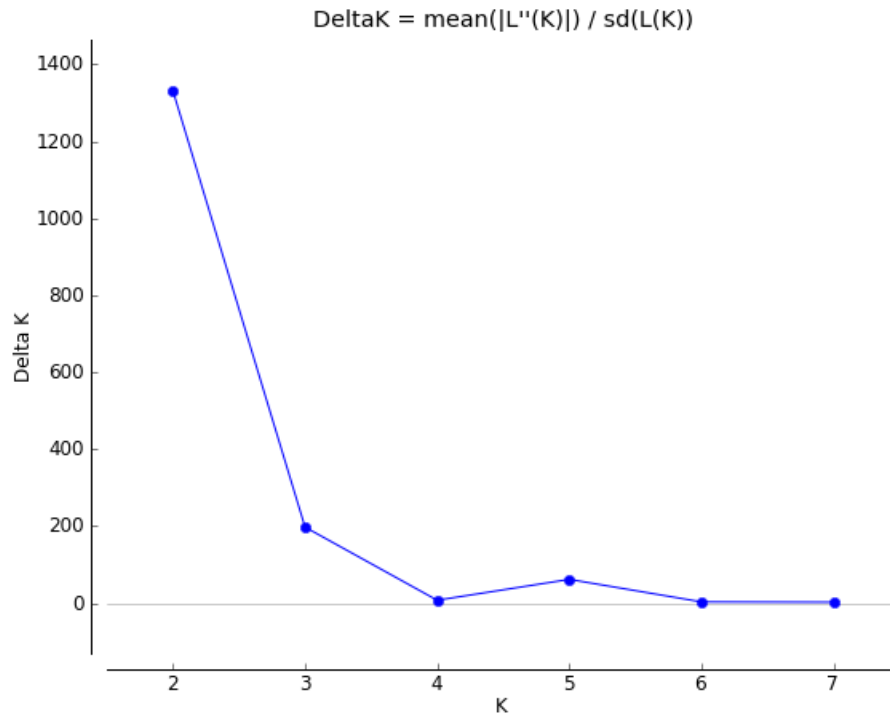
Populáció-páronkénti F_{ST} -értékek	Hu-D	Hu-B	Po-O
Hu-D	0,000		
Hu-B	0,038	0,000	
Po-O	0,289	0,312	0,000

Hu-D: Dunaföldvár, Hu-B: Biatorbágy, Po-O: Olsztyn, a 3 vizsgált állomány.



14. ábra. Nei-féle genetikai távolság alapján szerkesztett Neighbour-Joining dendrogram.
Hu-D: Dunaföldvár, Hu-B: Biatorbágy, Po-O: Olsztyn.

A populációk STRUCTURE analízissel meghatározott szerkezetét a 15. ábra mutatja. A vizsgált 3 populáció egymáshoz viszonyított szerkezetét mutatjuk be $K=2$ esetén (STRUCTURE HARVESTER analízis alapján 2 klaszter jelenléte a legvalószínűbb az adathalmazban), továbbá $K=3$ esetben (ugyanis 3 állomány vizsgálatát végeztük), valamint $K=5$ esetén (ugyanis a $K/\Delta K$ függvény grafikonján $K=5$ klaszterszámnál lokális maximumot detektáltunk) esetekben. A legvalószínűbb csoportszám $K=2$, azaz a 3, különböző helyről származó populáció genetikailag - az alkalmazott 12 polimorf mikroszatellit markerrel végzett analízis alapján - 2 külön csoportba sorolható be. Az egyik csoportot a 2 magyarországi mesterséges állomány alkotja (Hu-D és Hu-B), a másikat a természetes lengyel populáció (Po-O).



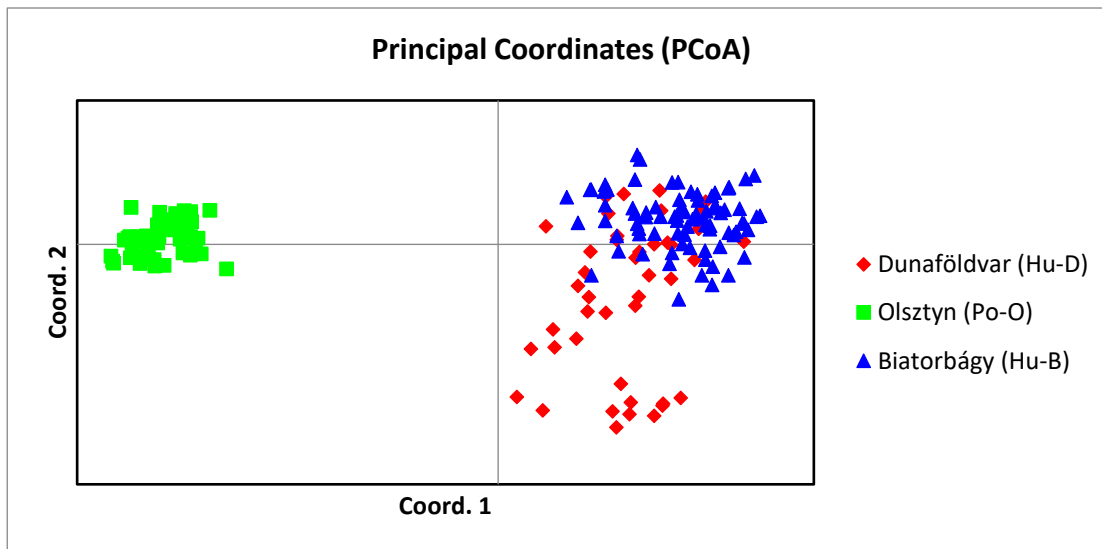
15. ábra. A STRUCTURE szoftverrel meghatározott populációszerkezet.

15.A ábra. A STRUCTURE HARVESTER programmal számított DeltaK függvény, melynek x-tengelye a vizsgált klaszterszámokat jeleníti meg, y-tengelye a DeltaK értékeket.

15.B ábra. A vizsgált 3 populáció legvalószínűbb K=2 csoportra különül el genetikailag, azonban bemutatjuk a K=3 csoportszámmal kapott eredményt is (ugyanis a vizsgált állományok is 3 különböző helyről származnak), valamint a K=5 klaszterszám mellett kapott eredményt (ugyanis a K/DeltaK függvény grafikonján K=5 csoportszámnál lokális maximumot detektáltunk, lsd. az ábra felső részén látható DeltaK függvény megjelenítésén).

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

A GENALEX szoftverrel számolt genetikai távolság alapján meghatározott PCoA (Principal Coordinate Analysis) analízis eredményét a 16. ábra mutatja be. Az ábra jól tükrözi a magyar állományok hasonlóságát és a lengyel populáció genetikai elkülönülését.



16. ábra. A GENALEX szoftverrel számolt genetikai távolság alapján meghatározott PCoA (Principal Coordinate) analízis eredménye.
Hu-D: Dunaföldvár, Po-O: Olsztyn, Hu-B: Biatorbágy.

A populációgenetikai analízisben alkalmazott markerek között csupán az *MS 428 Pf* és az *MS 439 Pf* markerek között tapasztaltunk kiegyensúlyozatlan kapcsoltságot. Mivel az *MS 439 Pf* marker egyébként is alacsony polimorfitású, a későbbi analízisekből ennek a markernek az alkalmazása mellőzhető. A null-allél jelenlétének valószínűségét, az allélkiesés valószínűségét, valamint a genotipizálási hibák valószínűségét az M9. Melléklet tartalmazza. Vizsgáltuk a markerek és az ivar kapcsoltságának lehetőségét is, azonban egyik lókuszt sem mutatott ivari kapcsoltságot egyik állományban sem.

Az eredmények alapján a süllőből és sügərből izolált markerek többségében kiválóan alkalmasak további vizsgálatokra, magas polimorfitásuk és könnyű felhasználhatóságuk következtében, nagy valószínűséggel közel rokon fajok esetében is.

4.3 Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*)

4.3.1 Könyvtárkészítés

Összesen 4 különböző CA-ismétlődéssel dúsított genomi könyvtárat hoztunk létre (*HaeIII* / *RsaI* / *AluI* / *HpyCH4V* restriktív enzimek használatával). 264 vizsgált klónból a kolónia PCR reakció alapján azt tapasztaltuk, hogy 128 klón hordozta 300 bp-nál hosszabb, a T-vektorba beépített konstrukciót. Ebből 127-nek tudtuk meghatározni a DNS szekvenciáját, melyek közül 118 hordozott mikroszatellit. Azonban a határoló szekvenciák hossza és nukleotid összetétele miatt csak 55 esetben

tudtunk a kimutatásukhoz PCR primereket tervezni és működésük körülményeit optimalizálni.

4.3.2 Az újonnan fejlesztett afrikai harcra markerek jellemzése

Az 55 mikroszatellit marker közül 49 működőképességét összesen 32 egyedben teszteltük. Bár ezek a minták 2 országból (Magyarország és Hollandia) származtak, az alacsony mintaszám miatt nem tekintettük őket külön populációnak. A 32 egyedben végzett analízis célja a markerek működőképességének meghatározása, valamint jellemzése volt. Ennek a vizsgálatnak az eredménye alapján kiválasztottuk a 8 leginkább polimorf egyedet, és a maradék 6 mikroszatellit ezeken az egyedeken teszteltük, ezek alapján jellemeztük. A markerek jellemzőit - mint a mikroszatellit lókuszt ismétlődő egységének szekvenciája, a vizsgált egyedszám, a detektált allélok száma és mérettartománya, valamint a várt (H_E) és megfigyelt (H_O) heterozigotizációs értékek, a Hardy-Weinberg Egyensúlytól való eltérés szignifikanciája, továbbá a génbanki azonosítók - az M10.1 Melléklet tartalmazza.

A markerenként detektált allélok száma 2-11 között alakultak, de a markerek több, mint fele (27 db) 5-6 allélt reprezentált és 7 rendelkezett nagyobb allél számmal. Az átlagos összállélszám 5,12. A legalacsonyabb várt heterozigotizációs (H_E) 0,117 (*MS 668 Cg*), a legmagasabb 0,793 (*MS 175 Cg*), a minimum és maximális megfigyelt heterozigotizációs értékek (H_O) 0,031 (*MS 663 Cg*) – 1,000 (*MS 3 Cg*, *MS 305 Cg*) között változtak. A várt és megfigyelt heterozigotizációs értékek közötti különbség közel a markerek felénél (22 marker) nem szignifikáns, azonban sok olyan markereknél (22 marker), ahol szignifikáns a különbség, ott ez a differencia igen jelentős ($P < 0,001^{***}$). Meghatároztuk a markerek PIC (Polymorphic Information Content) értékeit, az allélgazdagságukat (A_r), valamint a géndiverzitásukat. A legmagasabb mutatókkal az *MS 175 Cg* (PIC: 0,763; A_r : 10,024; géndiverzitás: 0,804) marker, a legalacsonyabbakkal az *MS 308 Cg* és az *MS 668 Cg* markerek rendelkeznek (ezek megegyeznek: PIC: 0,110; A_r : 1,875; géndiverzitás: 0,125). Az újonnan izolált markerek polimorfizációját jelző mutatóit az M10.2 Melléklet tartalmazza.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Elvégzett munkám alapján a következő új tudományos eredményeket értem el:

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

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

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

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

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

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

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1 Könyvtárkészítés

A dúsítás módszere (azaz a mikroszatellit tartalmú DNS fragmentek összegyűjtése) igen hatékonynak bizonyult, a tradicionális izolálási módszerekkel összevetve ([Rassmann et al. 1991](#); [Wu et al. 1994](#); [Cifarelli et al. 1995](#); [Richardson et al. 1995](#); [Lench et al. 1996](#); [Lunt et al. 1999](#)), továbbá hasonló hatékonyságú dúsítást értünk el más dúsítással bővített mikroszatellit izolálási módszerekhez viszonyítva ([Ostrander et al. 1992](#); [Karagoyozov et al. 1993](#); [Armour et al. 1994](#); [Kandpal et al. 1994](#)).

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

Összehasonlítva az új generációs szekvenáláson alapuló mikroszatellit és SNP marker izolálással, a dúsítás esetén a polimorfizmust tartalmazó szekvenciák száma ugyan két nagyságrenddel kevesebb, a költsége azonban az újgenerációs szekvenálások árának csökkenése ellenére is jóval alacsonyabb. A kivitelezéshez szükséges eszközrendszer nem tartalmaz speciális műszereket és nagy értékű gépeket (kivétel a kapilláris elektroforézis készülék). A könyvtárkészítés jóval egyszerűbb és kisebb munkaigényű, míg a primer tervezés és a markerek tesztelése ugyanolyan mértékű munkát és költséget jelent. Ráadásul a mikroszatellit markerek jóval polimorfabbak, mint az SNP markerek, emiatt mintegy háromszor kevesebb marker vizsgálatára van szükség a konzerváció biológiai és populációgenetikai munkák során. Megfelelően kialakított és jellemzett marker szett esetén pedig a kiértékelés automatizálása is megoldható ([Vignal et al. 2002](#); [Ekblom & Galindo 2011](#); [Davey et al. 2011](#); [Helyar et al. 2011](#); [Yue & Wang 2017](#)).

6.2 Süllő (*Sander lucioperca*)

Jelenleg a süllő populációkról továbbra is csekély genetikai információ áll rendelkezésre, csak néhány tanulmány jelent meg ([Björklund et al. 2007](#); [Kohlmann & Kersten 2008](#); [Gharibkhani et al. 2009](#); [Khurshut & Kohlmann 2009](#); [Poulet et al. 2009](#); [Saisa et al. 2010](#); [Onara et al. 2012](#); [Salminen et al. 2012](#); [Barmintseva et al. 2014](#); [Eschbach et al. 2014](#); [Han et al. 2016](#); [Louati et al. 2016](#)) annak ellenére, hogy e faj egyre jelentősebb szerepet kap az intenzív rendszerű haltermelésben. Munkánk során a Duna vízgyűjtőjén vizsgáltunk természetes vízi, tógazdasági és intenzív rendszerben tenyésztet süllő állományokat. Vizsgálatainkhoz olyan új genetikai markereket fejlesztettünk, melyek kibővíthetik az eddig alkalmazott, részben más fajokból adaptált markereket, és lehetőséget biztosítanak arra, hogy több információt tudhassunk meg a faj genetikai hátteréről.

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

Az új markerek közül 7 markerrel (*MS 192 Sl*, *MS 195 Sl*, *MS 198 Sl*, *MS 203 Sl*, *MS 260 Sl*, *MS 268 Sl*, *MS 397 Sl*) 10, a Duna vízgyűjtő területéről származó populáció és tenyészállomány genetikai variabilitását, szerkezetét és genetikai rokonságát vizsgáltuk. Kerestük az egyre fokozódó süllő telepítés, intenzív és tógazdasági termelés populációkra gyakorolt hatását, amelynek egyik jele, hogy a markerek többségénél, valamint a populációk összességét tekintve a várt és megfigyelt heterozigotizáció értékek között szignifikáns különbség mutatkozott, kismértékű heterozigóta-hiányt tapasztaltunk ($F_{IS} = 0,039$). Feltételezhetően ez részben a túlhalászat, részben pedig a mesterséges szaporításoknál alkalmazott alacsony egyedszám következménye lehet. A heterozigotizációt hosszú évtizedes, több generációs munkával jól átgondolt betelepítésekkel lehetne emelni.

A mikroszatellit markerrel végzett populációgenetikai analízisből kiderül, hogy a 10 populáció jelentős genetikai különbözőséget ($F_{ST} = 0,214$) mutat, de páronként vizsgálva találtunk olyanokat, amelyek ennél is jelentősebb mértékben különülnek el egymástól, mint például a német (Ge) populációtól jelentősen különböznek a győri (Gy), a kisbajcsi (Kb), a nyíregyházi (Ny) és a temesvári (Ti) állományok. Az összes populációtól leginkább a németországi Felső-Duna szakasz (Ge) populációja különül el, itt az egyedi allélok frekvenciája is magasabb a többi populációhoz képest. A legnagyobb genetikai diverzitást a kisbajcsi (Kb) intenzív rendszer mutatta, ami nagy valószínűséggel annak köszönhető, hogy a mintavételt megelőzően többször frissítették az anyaállományt külső forrásból származó anyákkal.

Ezt támasztja alá a populációk genetikai távolsága alapján készült törzsfa is, amelyen a vad populációk egymáshoz viszonyítva a földrajzi elhelyezkedésüknek megfelelően található meg (vagyis a balatoni állomány a dendrogram két szélén elhelyezkedő Duna-deltai (De) és a felső dunai (Ge) állomány között található). Azonban a tógazdasági és intenzív rendszerekben tenyésztett állományok nem illeszthetők be ebbe a rendszerbe és jól kirajzolódik, hogy mely állományok kialakítása épül ugyanarra a genetikai bázisra. Így például a kisbajcsi (Kb) és nyíregyházi (Ny) állományok (földrajzi távolság ~310 km) genetikailag közelebb állnak egymáshoz, mint a földrajzilag egymáshoz közeli (~7,2 km) intenzív tápos nevelésre szelektált kisbajcsi (Kb) és győri (Gy) állományok. A győri állomány (Gy) az attalai (At, földrajzi távolság ~145 km), valamint az akasztói (Ak, földrajzi távolság ~305 km) állományokkal mutat nagy hasonlóságot, ugyanis a győri állományt akasztói és attalai származású egyedekből alakították ki (személyes közlés). A dalmádi (Da) állományt

a tenyésztők információja szerint is a Balatonból (~50 km) származó egyedekkel hozták létre, és genetikailag ehhez is áll közel.

A populációk genetikai struktúrájának vizsgálata ezzel teljesen megegyező eredményre vezetett, amely szerint a 10 populáció legnagyobb valószínűséggel 6 csoportra tagolódik. A dalmandi (Da) populációt balatoni (Ba) anyahalak révén, a győri (Gy) állományt az akasztói (Ak), valamint az attalai (At) halgazdaságokból, továbbá a kisbajcsi (Kb) intenzív rendszer állományát a nyíregyházi (Ny) halgazdaságból származó halak révén hozták létre.

Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy süllő esetén az elmúlt tíz évben bekövetkezett tartástechnológiai fejlesztések ([Zakes et al. 2013](#); [Zarski et al. 2013](#); [Policar et al. 2016](#); [Blecha et al. 2016](#)) és tenyésztési programok ([Abdolmalaki & Psuty 2007](#); [Björklund et al. 2007](#); [Menezes et al. 2013](#); [Lappalainen et al. 2016](#)) még nem gyakoroltak jelentős hatást a természetes vízi süllő állományokra, bár a túlzott halászatnak és visszatelepítéseknek köszönhetően megfigyelhető némi eltérés a Hardy-Weinberg egyensúlyban. Az egyre intenzívebb tenyésztés, a szelektációs programok és visszatelepítések azonban a faj genetikai bázisának jelentős degradációjához, az elkülönült változatok eltűnéséhez és a genetikai háttér felhígulásához, uniformizálódáshoz vezethet, úgy mint például a régóta tenyésztésbe vont ponty ([Hulak et al. 2010](#)), vagy sebes pisztráng ([Ward 2006](#)) esetén. Mindezt felismerve aktuálisá vált a génmegőrzési munka elindítása, a faj genetikai értékeinek megőrzése érdekében. Ehhez igen nagy segítséget nyújthat a költségek csökkentése érdekében fejlesztett multiplex PCR alkalmazása, mellyel 16 mikroszatellit lókuszt tudunk vizsgálni.

6.3 Sügér (*Perca fluviatilis*)

Az elmúlt közel 20 év során számos tanulmány jelent meg természetes sügér populációk és tenyésztett állományok genetikai diverzitásáról, valamint az antropogén hatások monitorozásáról. A tanulmányok többsége Ny-Európában ([Gerlach et al. 2001](#); [Khadher et al. 2015](#); [Khadher et al. 2016](#)) és É-Európában ([Bergek & Björklund 2007](#); [Bergek & Björklund 2009](#); [Bergek et al. 2010](#); [Olsson et al. 2011](#)) élő állományokat vizsgál, továbbá egyetlen tanulmány ázsiai sügér állományokkal foglalkozik ([Yang et al. 2012](#)), azonban közép-európai természetes és mesterséges körülmények között tartott sügér-közösségeit eddig még nem vizsgálták genetikai markerekkel. Ezeknek a tanulmányoknak nagyobb hányadát *Sander vitreus*-ból és *Perca falvecens*-ből, a *Percidae* család amerikai kontinensen élő, rokon fajából izolált mikroszatellitekkel végezték. Azonban a közelrokon fajokból izolált mikroszatellitek nem minden esetben alkalmazhatóak, sőt, gyakran alacsonyabb polimorfítást mutatnak más fajokban ([Yue et al. 2010](#)). Elsőként Yang és munkatársai ([2009](#)), később Pukk és munkatársai ([2014](#)) izolálták mikroszatelliteket *P. fluviatilis*-ből. Jelen tanulmányban ezt a munkásságot kívánjuk folytatni, újabb, fajspecifikus mikroszatellit markerek fejlesztésével, növelve

az így létrehozott genetikai eszközzel, valamint ezek felhasználásával elsőként monitoroztuk közép-európai állományok genetikai differenciáltságát.

Vizsgálatunkhoz a mintagyűjtést követően DNS-t nyertünk ki, majd 2 mikroszatellittel dúsított genomi könyvtárat hoztunk létre (*Rsa I.*, *HpyCH4 V*) Glenn és Schable (2005) kis mértékben módosított dúsítási módszerével. Az eredmények azt mutatják, hogy - ebben az esetben is - az alkalmazott könyvtárkészítés hatékonysága közel optimális, mivel a vizsgált inszertek, több mint 92% egyedi szekvenciát hordozott, mindemellett a dúsítás is igen hatékonynak bizonyult, ugyanis a kapott szekvenciák 93%-ban hordoztak mikroszatellitekre jellemző ismétlődő régiót. A szekvencia meghatározást követően a mikrosatellit hordozó szekvenciákra PCR-primerket terveztünk, működésük körülményeit meghatároztuk, majd a markerek polimorfizmusát teszteltük 8 egyeden. A fejlesztett markerek közül 12-vel populációgenetikai analízist végeztünk, melybe 2 magyarországi intenzív mesterséges állományt (Hu-D: Dunaföldvár, Hu-B: Biatorbágy) és egy lengyelországi természetes populációt (Po-O: Olsztyń) vontunk be.

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

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

Munkánk során olyan új genetikai eszközzel fejlesztettünk, amely önmagában is, valamint a korábban leírt genetikai markerek mellé is, jól alkalmazhatóak genetikai variabilitás megállapítására sügér populációkban, valamint feltehetőleg a *Percidae* család más képviselőiben is. Az általunk alkalmazott módszer jól alkalmazható lehet olyan közeli fajok esetében is, amelyek esetén még egyáltalán nem izoláltak nagy polimorfizmusú genetikai markereket, vagy a jelenlegi eszköztár még

további bővítésre szorul. Munkánk egyedülálló abból a szempontból, hogy ez a tanulmány foglalkozik először mikroszatellit alapú vizsgálattal a közép-európai sügér esetén.

6.4 Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*)

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

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során olyan ragadozó halfajok (süllő, sügér, afrikai harcsa) genetikai hátterét vizsgáltuk, melyek jelentősége hazánkban is rohamosan fokozódik a növekvő fogyasztói igények kielégítése végett. Bár az afrikai harcsa termelés igen kiemelkedő helyen szerepel hazánkban európai szinten is, addig a süllő és a sügér termelés növelésére nagy erőfeszítések zajlanak Európa-szerte. A tartástechnológiai fejlesztések, valamint az egyre nagyobb fontossággal bíró génmegőrzés érdekében egyre mélyrehatóbb genetikai ismeretek szükségesek a vizsgált fajokról. Ezért célul tűztük ki, hogy az eddig – genetikai szempontból – kevésbé vizsgált süllőből, sügérből és afrikai harcsából fajspecifikus polimorf mikroszatellit markereket izoláljunk genetikai diverzitásuk meghatározására, populáció szerkezetük megállapítására, valamint az antropogén hatások igazolására.

A süllő genomi DNS-éből kétféle restriktációs enzim használatával (*Rsa I*, *HpyCH4 V*) két CA-dinukleotid ismétlődésekben dúsított könyvtárat hoztunk létre, melyekből összesen 34 új polimorf mikroszatellit izoláltunk. A markerek szekvenciáit GenBank adatbázisba helyeztük, a kimutatásukhoz szükséges PCR reakciók optimális körülményeit meghatároztuk. Az újonnan izolált markerek működőképességét legkevesebb 8 egyedben teszteltük, mely során meghatároztuk a markert jellemző allélokot és azok jellemző mérettartományát, valamint a polimorfitásukat jellemző paramétereket. 7 polimorf markerrel (*MS 192 Sl*, *MS 195 Sl*, *MS 198 Sl*, *MS 203 Sl*, *MS 260 Sl*, *MS 268 Sl*, *MS 397 Sl*) populációgenetikai analízist végeztünk 10, a Duna vízgyűjtő területéről származó állomány genetikai diverzitásának becslésére, valamint az antropogén hatások monitorozására. A populációgenetikai analízis során meghatároztuk az átlagos allélszámot (4,09), az össz-allélgazdagságot (5,32), vizsgáltuk, hogy az állományok Hardy-Weinberg egyensúlyban vannak-e, és azt tapasztaltuk, hogy csupán a Temesvári (Ti), továbbá a Duna felső szakaszán vizsgált populációk (Ge) vannak egyensúlyi állapotban. A legnagyobb mértékű heterozigóta hiányt az akasztói (Ak) állományban detektáltunk, heterozigóta többletet csupán a kisbajcsi (Kb) állományban tapasztaltunk. Legtöbb privát allélt a németországi populációban (Ge) találtunk. Úgy tapasztaltuk, hogy a vizsgált állományok genetikai differenciáltságának mértéke jelentősnek mondható ($F_{ST}=0,214$), valamint, hogy STRUCTURE szoftverrel vizsgálva a 10 populáció 6 genetikai klaszterbe sorolható. Azoknál a csoportoknál, amelyek több állományt foglalnak magukba, jól nyomon követhető az antropogén hatás, ugyanis a mesterséges állományok kialakítása nem a földrajzilag legközelebb álló természetes populációból történt (pl. egy klaszterbe tartoznak a győri, az attalai és az akasztói állományok, vagy egy másik klaszterbe a kisbajcsi és nyíregyházi állományok). Az újonnan fejlesztett markerek közül 16 markerrel tovább fejlesztettük az analízist, ezekkel 4 szettet alakítottunk, ki úgy, hogy egyetlen reakcióban egyszerre 4 marker kimutatása legyen lehetséges, így

csökkentettük az analízis idő- és munkaigényét, valamint a felhasznált anyagok mennyiségét.

Süger esetén a könyvtárkészítéshez izolált DNS hasításához alkalmazott restriktációs enzimekkel (*Rsa I*, *HpyCH4 V*) 2-féle CA-ismétlődésekben dúsított könyvtárat hoztunk létre, melyekből összesen 25 esetben sikerült működőképes markert fejlesztenünk. A markerek optimális működési körülményeit meghatároztuk és 8 kiválasztott egyeden teszteltük, mely vizsgálat alapján jellemeztük a markereket (jellemző allélok, mérettartományok, polimorfitásukat jellemző paraméterek). Néhány marker különösen magas polimorfitásúnak bizonyult (*MS 427 Pf*, *MS 428 Pf*, *MS 464 Pf*, *MS 726 Pf*). Az újonnan fejlesztett markerek közül 12-vel (*MS 426 Pf*, *MS 427 Pf*, *MS 428 Pf*, *MS 439 Pf*, *MS 464 Pf*, *MS 467 Pf*, *MS 500 Pf*, *MS 719 Pf*, *MS 725 Pf*, *MS 726 Pf*, *MS 732 Pf*, *MS 739 Pf*) vizsgáltuk a genetikai differenciáltság mértékét 2 hazai tógazdasági és egy lengyelországi természetes süger populáció között. A populációgenetikai analízis alapján az átlagos allélszám (9,611) magasnak mutatkozott, azonban a heterozigóta hiány is jelentősnek mondható mindhárom állományban, a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés mindhárom populációban szignifikáns. Ez az állapot feltehetőleg az antropogén hatásoknak is köszönhető. A lengyel populáció jelentősen eltér a két, egymáshoz igencsak hasonló, magyar állománytól genetikai szempontból, hiszen a lengyel populációban kiemelkedően magas a privát allélok száma, nagy a különbség a populációpáronkénti F_{ST} értékekben ($>0,3$), a Nei-féle genetikai távolságban ($>0,6$), de ezt támasztják alá a STRUCTURE-, valamint a PCoA-analízisek is.

Az afrikai harcsa esetében összesen 4, különböző CA-ismétlődéssel dúsított genomi könyvtárat hoztunk létre (*HaeIII / RsaI / AluI / HpyCH4V*). 55 esetben tudtunk a kimutatásukhoz PCR primereket tervezni és működésük körülményeit optimalizálni. Az 55 mikroszatellit marker közül 49 működőképességét összesen 32 egyeden teszteltük. A 32 egyeden végzett analízis célja a markerek működőképességének meghatározása, valamint jellemzése volt (allélok számának, mérettartományuk, valamint polimorfitásukat jellemző további paraméterek meghatározása). A markerek bár polimorfnak mutatkoztak (allélszám 2 és 11 között alakultak), a polimorfitásuk mértéke a többségüknél alacsonynak mondható, azonban alkalmazásukkor ez ellensúlyozható azzal, ha az analízisbe több markert vonunk be.

A létrehozott genetikai eszköztárral további - süllővel, sügérral és afrikai harcsával, továbbá ezeknek közel rokon fajaival foglalkozó - tanulmányokat kívánunk támogatni. Ebben a tanulmányban kimutatott antropogén hatások is megerősítik azt a tényt, hogy a tenyésztés a genetikai diverzitás csökkenését idézi elő, a nem átgondolt állomány keresztezés a genetikai különbségek összemosásához vezet és felhívja a figyelmet, hogy ezen állományok többségénél időszerű a genetikai „frissítés”, megfelelően polimorf egyedek bevonásával.

8. SUMMARY

In our work we examined the genetic background of carnivorous fish species (pike-perch, perch, African catfish), whose importance in Hungary is growing rapidly in order to meet the increasing consumer demand. Although African catfish production has outstanding importance in Hungary, great efforts are being made across Europe to increase the production of pike-perch and perch. More and more in-depth genetic knowledge of the species studied is needed to support the development of breeding technology and the growing importance of gene conservation. Therefore, we aimed to isolate species-specific polymorphic microsatellite markers from pike-perch, perch and African catfish - which are not yet well known in genetic aspect - to determine their genetic diversity, to identify their population structure, and to assess the anthropogenic effects.

Two CA-repeats enriched libraries were constructed from pike-perch genomic DNA with using two different restriction enzymes (*Rsa I*, *HpyCH4 V*), of which 34 new polymorphic microsatellites were isolated. The sequences of the markers were placed in the GenBank database, and optimal conditions for the PCR reactions required for their detection were determined. The functionality of the newly isolated markers were tested on at least 8 individuals, in which the number and size ranges of alleles were determined, as well as the parameters characteristic of their polymorphism. A population genetic analysis was carried out with 7 polymorphic markers (*MS 192 S1*, *MS 195 S1*, *MS 198 S1*, *MS 203 S1*, *MS 260 S1*, *MS 268 S1* and *MS 397 S1*) to estimate genetic diversity of 10 populations from the Danube River Basin and to establish the anthropogenic effects. During the population genetic analysis we determined the average number of alleles (4.09), the total allelic richness (5.32), whether the stocks were in Hardy-Weinberg equilibrium, and we have found that only the stock of Timisoara (Ti) and the population from the Upper-Danube (Ge) are in equilibrium. We found the greatest heterozygous deficiency in the stock of Akasztó (Ak), and heterozygous excess was found only in the stock Kisbajcs (Kb). Most private alleles were found in the German population (Ge). We found that the genetic differentiation of the examined stocks were remarkable ($F_{ST} = 0.214$), and that the 10 populations could be classified into 6 genetic clusters using STRUCTURE software. For clusters that include multiple stocks, anthropogenic effects can be well tracked, since the creation of artificial stock was not done from the geographically closest natural population (e.g. one cluster includes the Győr, Attala, and Akasztó stocks, or another cluster involves the stocks of Kisbajcsi and Nyíregyháza). With 16 microsatellites of the newly developed markers further developed analyses were carried out, with these markers set up 4 sets, so that 4 markers can be detected in a single reaction at one time (multiplex PCRs). We have reduced the time and effort required for analysis and the amount of materials used.

In case of perch, as well, two CA-repeats enriched genomic libraries were constructed by two restriction enzymes (*Rsa I*, *HpyCH4V*), of which 25 functional markers were developed. Optimal function conditions (PCR conditions) of the markers were determined and tested on 8 selected individuals, in this way the properties of markers were defined (number of alleles, allele size ranges, parameters characteristic of their polymorphism). Some markers have been shown extremely high polymorphism (*MS 427 Pf*, *MS 428 Pf*, *MS 464 Pf* and *MS 726 Pf*). Of the newly developed markers, 12 (*MS 426 Pf*, *MS 427 Pf*, *MS 428 Pf*, *MS 439 Pf*, *MS 464 Pf*, *MS 467 Pf*, *MS 500 Pf*, *MS 719 Pf*, *MS 725 Pf*, *MS 726 Pf*, *MS 732 Pf* and *MS 739 Pf*) were tested for genetic differentiation between 2 domestic Hungarian pond farms and a Polish natural population. Based on population genetic analysis, the average number of alleles (9.611) was high, but the heterozygous deficiency and the deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium were significant in all three populations. This condition may have been induced by anthropogenic effects. The Polish population is significantly different in the genetic aspect from the two Hungarian populations, which are quite similar, as the number of private alleles is very high in the Polish population, there is a big difference in the F_{ST} (>0.3) and in the Nei's distance (>0.6) of population pairs, and this is also supported by STRUCTURE and PCoA analyses.

In the case of African catfish, 4 different genomic libraries enriched with CA repeats were constructed (*HaeIII* / *RsaI* / *AluI* / *HpyCH4V*). In 55 cases PCR primers were designed for microsatellites detection and optimize their operating conditions (PCR conditions). Of the 55 microsatellite markers, 49 were tested for functionality in a total of 32 individuals. The purpose of the analysis on the 32 individuals was to determine and characterize the functionality of the markers (to determine the number of alleles, their size range, and further parameters characteristic of their polymorphism). Although the markers were polymorphic (the number of alleles was between 2 and 11), the degree of polymorphism was low in most of them, however, when applied, and this could be counterbalanced by the inclusion of multiple markers in the analysis.

We want to support further studies - dealing with pike-perch, perch and African catfish, as well as close to related species - with the above mentioned genetic tools. The anthropogenic effects shown in this study also confirm the fact that breeding leads to a decrease in genetic diversity, a non-thoughtful stock crossing leads to the losing of genetic differences and draws attention to the fact that the majority of these stocks are necessary genetically “refreshing” with the involvement of polymorph individuals.

9. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- Abdelkrim, J.; Robertson, B.C.; Stanton, J.L. and Gemmell, N.J. 2009. 'Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing', *BioTechniques*, 46: 185-92.
- Abdolmalaki, S. and Psuty, I. 2007. 'The effects of stock enhancement of pikeperch (*Sander lucioperca*) in Iranian coastal waters of the Caspian Sea', *ICES Journal of Marine Science*, 64: 973-80.
- Amos, W. and Rubinsztein, D.C. 1996. 'Microsatellites are subject to directional evolution', *Nature Genetics*, 12.
- Andrés, J.A. & Bogdanowicz, S.M. 2011. 'Isolating Microsatellite Loci: Looking Back, Looking Ahead.' in V. & Rockman Orgogozo, M.V. (ed.), *Molecular Methods for Evolutionary Genetics* (Humana Press: London, UK).
- Apablaza, P.; Brevik, Ø.J.; Mjøs, S.; Valdebenito, S.; Iardi, P.; Battaglia, J.; Dalsgaard, I. and Nylund, A. 2015. 'Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) analysis of *Flavobacterium psychrophilum* from salmonids in Chile and Norway', *BMC Veterinary Research*, 11.
- Armour, J.A.L.; Neumann, R.; Gobert, S. and Jeffreys, A.J. 1994. 'Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection', *Human Molecular Genetics*, 3: 599-605.
- Awodiran, M. O.; Adeniran, F. O.; Akinwale, R. O. and Akinwande, A. A. 2019. 'Microsatellite Variability of Two Populations of *Clarias gariepinus* (Siluriformes, Clariidae) in Nigeria', *Vestnik Zoologii*, 53: 195-208.
- Barmintseva, A.E.; Shalgimbayeva, G.M.; Koishybayeva, S.K.; Sarbakanova, Sh.T.; Asylbekova, S.Z.; Isbekov, K.B. and Mugue, N.S. 2014. 'Genetic Study of Pike Perch *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758) and Bersh *Sander volgensis* (Gmelin, 1789) from the Fishery Water-Bodies of Kazakhstan', *Russian Journal of Genetics*, 50: 749-56.
- Belkhir, K.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N. and Bonhomme, F. 1999. 'GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations'. <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>.
- Béres, B.; Kánainé, S.D.; Müller, T.; Staszny, Á.; Farkas, M.; Bakos, K.; Orbán, L.; Urbányi, B. and Kovács, B. 2017. 'Species-specific markers provide molecular genetic evidence for natural introgression of bullhead catfishes in Hungary', *PeerJ*, 5:e2804.
- Bergek, S. and Björklund, M. 2007. 'Cryptic barriers to dispersal within a lake allow genetic differentiation of Eurasian perch', *Evolution*, 61: 2035-41.
- Bergek, S. and Björklund, M. 2009. 'Genetic and morphological divergence reveals local subdivision of perch (*Perca fluviatilis* L.)', *Biological Journal of the Linnean Society*, 96: 746-58.
- Bergek, S.; Sundblad, G. and Björklund, M. 2010. 'Population differentiation in perch *Perca fluviatilis*: environmental effects on gene flow?', *Journal of Fish Biology*, 76: 1159-72.
- Bernatchez, L.; Guyomard, R. and Bonhomme, F. 1992. 'DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations', *Molecular Ecology*, 1: 161-73.
- Beuzen, N.D.; Stear, M.J. and Chang, K.C. 2000. 'Molecular markers and their use in animal breeding', *The Veterinary Journal*, 160: 42-52.
- Billington, N. 1998. 'Genetic variation in percids determined by mitochondrial DNA analysis', *Italian Journal of Zoology*, 65: 35-40.
- Billington, N.; Danzmann, R.G.; Hebert, P.D.N. and Ward, R.D. 1991. 'Phylogenetic relationships among four members of *Stizostedion* (Percidae) determined by mitochondrial DNA and allozyme analyses', *Journal of Fish Biology*, 39: 251-58.
- Billington, N.; Hebert, P.D.N. and Ward, R.D. 1990. 'Allozyme and Mitochondrial DNA Variation among Three Species of *Stizostedion* (Percidae): Phylogenetic and Zoogeographical Implications', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 1093-102.

- Birky, C.W.; Fuerst, P. and Maruyamat, T. 1989. 'Organelle Gene Diversity Under Migration, Mutation, and Drift: Equilibrium Expectations, Approach to Equilibrium, Effects of Heteroplasmic Cells, and Comparison to Nuclear Genes', *Genetics*, 121: 613-27.
- Björklund, M.; Aho, T. and Larsson, L.C. 2007. 'Genetic differentiation in pikeperch (*Sander lucioperca*): the relative importance of gene flow, drift and common history', *Journal of Fish Biology*, 71: 264-78.
- Blecha, M.; Kristan, J. and Policar, T. 2016. 'Adaptation of Intensively Reared Pikeperch (*Sander lucioperca*) Juveniles to Pond Culture and Subsequent Re-Adaptation to a Recirculation Aquaculture System', *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16: 15-18.
- Borer, S.O.; Miller, L.M. and Kapuscinski, A.R. 1999. 'Microsatellites in walleye *Stizostedion vitreum*', *Molecular Ecology*, 8: 336-38.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. 'Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms', *The American Journal of Human Genetics*, 32: 314-31.
- Brown, W.M.; George, M. and Wilson, A.C. 1979. 'Rapid evolution of animal mitochondrial DNA', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 1967-71.
- Bruford, M.W. and Wayne, R.K. 1993. 'Microsatellites and their application to population genetic studies', *Current Opinion in Genetics and Development*, 3: 939-43.
- Callen, D.F.; Thompson, A.D.; Shen, Y.; Phillips, H.A.; Richards, R.I.; Mulley, J.C. and Sutherland, G.R. 1993. 'Incidence and Origin of "Null" Alleles in the (AC)_n Microsatellite Markers', *The American Journal of Human Genetics*, 52: 922-27.
- Carter, R.E.; Mair, G.C.; Skibinski, D.O.F.; Parkin, D.T. and Beardmore, J.A. 1991. 'The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia', *Aquaculture*, 95: 41-52.
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P. and Stephan, W. 1994. 'The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes', *Nature*, 371: 215-20.
- Chee, M.; Yang, R.; Hubbell, E.; Berno, A.; Huang, X.C.; Stern, D.; Winkler, J.; Lockhart, D.J.; Morris, M.S. and Fodor, S.P.A. 1996. 'Accessing Genetic Information with High-Density DNA Arrays', *Science*, 274: 610-14.
- Chistiakov, D.A.; Hellemans, B. and Volckaert, F.A.M. 2006. 'Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics', *Aquaculture*, 255: 1-29.
- Cifarelli, R.A.; Gallitelli, M. and Cellini, F. 1995. 'Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones', *Nucleic Acids Research*, 23: 3802-03.
- Ciftci, Y. and Okumus, I. 2002. 'Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics', *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2: 145-55.
- Cnaani, A.; Hallerman, E.M.; Ron, M.; Weller, J.I.; Indelman, M.; Kashi, Y.; Gall, G.A.E. and Hulata, G. 2003. 'Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F₂ tilapia hybrid', *Aquaculture*, 223: 117-28.
- Coykendall, D.K.; Stott, W.; Morrison, C.L. and Springmann, M.J. 2014. 'Development of eighteen microsatellite loci in walleye (*Sander vitreus*)', *Conservation Genetics Resources*, 6: 1019-21.
- Csorbai, B. 2015. 'Süllő (*Sander lucioperca* LINNAEUS, 1758).' in B. Csorbai, Péteri, A., Urbányi, B. (ed.), *Intenzív haltenyésztés* (Szent István Egyetem: Gödöllő, Hungary).
- Davey, J.W.; Hohenlohe, P.A.; Etter, P.D.; Catchen, J.M. and Blaxter, M.L. 2011. 'Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing', *Genetics*, 12: 499-510.
- Davis, G.P. and Hetzel, D.J.S. 2000. 'Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species', *Aquaculture Research*, 31: 3-10.

- Earl, D.A. and vonHoldt, B.M. 2012. 'STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method', *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-61.
- Eklblom, R. and Galindo, J. 2011. 'Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms', *Heredity*, 107: 1-15.
- Ellegren, H. 2000. 'Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference', *TRENDS in Genetics*, 16: 551-58.
- Ellegren, H. 2002. 'Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation', *TRENDS in Genetics*, 18: 70.
- Engle, C.R, Quagraine, K.K., Dey, M.M. 2017. *Seafood and Aquaculture Marketing Handbook* (Wiley Blackwell: UK).
- Eschbach, E.; Nolte, A.W.; Kohlmann, K.; Kersten, P.; Kail, J. and Arlinghaus, R. 2014. 'Population differentiation of zander (*Sander lucioperca*) across native and newly colonized ranges suggests increasing admixture in the course of an invasion', *Evolutionary Applications*, 7: 555-68.
- Evanno, G.; Regnaut, S. and Goudet, J. 2005. 'Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE : a simulation study', *Molecular Ecology*, 14: 2611-20.
- Excoffier, L.; Laval, G. and Schneider, S. 2005. 'Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis', *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Ezilrani, P. and Christopher, J.G. 2015. 'Genetic variation and differentiation in African catfish, *Clarias gariepinus*, assessed by heterologous microsatellite DNA', *Indian Journal of Biotechnology*, 14: 388-93.
- Ezilrani, P.; Marimuthu, K. and Christopher, J.G. 2016. 'Genetic diversity of African catfish *Clarias gariepinus* in South India evaluated by microsatellite DNA', *International Journal of Zoology and Applied Biosciences*, 1: 248-56.
- FAO. 2014. 'Global production for *Perca fluviatilis*'. <http://www.fao.org/fishery/species/2298/en>.
- FAO. 2017. 'Fishery and Aquaculture Statistics. Global production by production source 1950-2015 (FishstatJ)'. www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en.
- Focardi, S.; Corsi, I. and Franchi, E. 2005. 'Safety issues and sustainable development of European aquaculture: new tools for environmentally sound aquaculture', *Aquaculture International*, 13: 3-17.
- Frankic, A. and Hershner, C. 2003. 'Sustainable aquaculture: developing the promise of aquaculture', *Aquaculture International*, 11: 517-30.
- Galbusera, P.; Volckaert, F.A.; Hellemans, B. and Ollevier, F. 1996. 'Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)', *Molecular Ecology*, 5: 703-05.
- Galbusera, P.; Volckaert, F.A.M. and Ollevier, F. 2000. 'Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation', *Aquaculture*, 185: 25-42.
- Gerlach, G.; Schardt, U.; Eckmann, R. and Meyer, A. 2001. 'Kin-structured subpopulations in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.)', *Heredity*, 86: 213-21.
- Gharibkhani, M.; Pourkazemi, M.; Soltani, M.; Rezvani, S. and Azizzadeh, L. 2009. 'Population genetic structure of Pikeperch (*Sander lucioperca* Linnaeus, 1758) in the Southwest Caspian Sea using microsatellite markers', *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4: 161-68.
- Glenn, T.C and Schable, N.A. 2005. 'Isolating Microsatellite DNA Loci', *Methods in Enzymology*, 395: 202-22.
- Goudet, J. 1995. 'FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics', *Journal of Heredity*, 86: 485-86.
- Grobler, J.P. and Van der Bankt, F.H. 1994. 'Allozyme polymorphism and phenotypic variation in African catfish (*Clarias gariepinus*)', *Comp. Biochem. Physiol*, 107B: 111-16.
- Guo, S.W. and Thompson, E.A. 1992. 'Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles', *Biometrics*, 48: 361-72.

- Hamilton, M.B.; Pincu, E.L.; Di Fiore, A. and Fleischer, R.C. 1999. 'Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites', *BioTechniques*, 27: 500-07.
- Han, X.; Ling, Q.; Li, C.; Wang, G.; Xu, Z. and Lu, G. 2016. 'Characterization of pikeperch (*Sander lucioperca*) transcriptome and development of SSR markers', *Biochemical Systematics and Ecology*, 66: 188-95.
- Harding, R.M.; Boyce, A.J. and Clegg, J.B. 1992. 'The Evolution of Tandemly Repetitive DNA: Recombination Rules', *Genetics*, 132: 847-59.
- Heldstab, H. and Katoh, M. 1995. 'Low genetic variation in perch (*Perca fluviatilis* L.) from three major European drainage systems in Switzerland', *Aquatic Sciences*, 57: 14-19.
- Helyar, S.J.; Hemmer-Hansen, J.; Bekkevold, D.; Taylor, M.I.; Ogden, R.; Limborg, M.T.; Cariani, A.; Maes, G.E.; Diopere, E.; Carvalho, G.R. and Nielsen, E.E. 2011. 'Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges', *Molecular Ecology Resources*, 11: 123-36.
- Horváth, Á.; Hoitsy, Gy.; Kovács, B.; Kánainé, S.D.; Osz, Á.; Bogataj, K. and Urbányi, B. 2014. 'The effect of domestication on a brown trout (*Salmo trutta m fario*) broodstock in Hungary', *Aquaculture International*, 22: 5-11.
- Horváth, L. and Staszny, Á. 2013. 'A süllő biológiája.' in L. Horváth, Urbányi, B., Horváth, Á. (ed.), *A süllő (Sander lucioperca) biológiája és tenyésztése* (Szent István Egyetem: Gödöllő, Hungary).
- Hubisz, M.; Falush, D.; Stephens, M. and Pritchard, J. 2009. 'Inferring weak population structure with the assistance of sample group information', *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322-32.
- Hughes, C.R. and Queller, D.C. 1993. 'Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism', *Molecular Ecology*, 2: 131-37.
- Hulak, M.; Kaspar, V.; Kohlmann, K.; Coward, K.; Tešitel, J.; Rodina, M.; Gelam, D.; Kocour, M. and Linhart, O. 2010. 'Microsatellite-based genetic diversity and differentiation of foreign common carp (*Cyprinus carpio*) strains farmed in the Czech Republic', *Aquaculture*, 298: 194-201.
- Hunter, R.L. and Markert, C.L. 1957. 'Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels', *Science*, 125: 1294-95.
- Jarne, P. and Lagoda, P.J.L. 1996. 'Microsatellites, from molecules to populations and back', *Trends in Ecology & Evolution*, 11: 424-29.
- Johns, G.C. and Avise, J.C. 1998. 'A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome b Gene', *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1481-90.
- Kahilainen, K.K.; Teacher, A.G.F.; Kahkonen, K.; Vinni, M.; Lehtonen, H. and Merila, J. 2011. 'First record of natural hybridization and introgression between pikeperch (*Sander lucioperca*) and perch (*Perca fluviatilis*)', *Annales Zoologici Fennici*, 48: 39-44.
- Kandpal, R.P.; Kandpal, G. and Weissman, S.M. 1994. 'Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 88-92.
- Karagyozov, L.; Kalcheva, I.D. and Chapman, V.M. 1993. 'Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats', *Nucleic Acids Research*, 21: 3911-12.
- Kashi, Y.; King, D. and Soller, M. 1997. 'Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variance', *TRENDS in Genetics*, 13: 74-78.
- Kennedy, B.W.; Quinton, M. and van Arendonk, J.A.M. 1992. 'Estimation of Effects of Single Genes on Quantitative Traits', *Journal of Animal Science*, 70: 2000-12.
- Khadher, S.B.; Agnèse, J.-F.; Milla, S.; Teletchea, F. and Fontaine, P. 2015. 'Patterns of genetic structure of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) in Lake Geneva at the end of the spawning season', *Journal of Great Lakes Research*, 41: 846-52.
- Khadher, S.B.; Fontaine, P.; Milla, S.; Agnèse, J.-F. and Teletchea, F. 2016. 'Genetic characterization and relatedness of wild and farmed Eurasian perch (*Perca fluviatilis*): Possible implications for aquaculture practices', *Aquaculture Reports*, 3: 136-46.

- Khurshut, E. and Kohlmann, K. 2009. 'Application of nine species-specific microsatellite loci to characterize three pike-perch (*Sander lucioperca*) populations from the Aral Sea basin in Uzbekistan', *Environmental Biotechnology*, 5: 3-10.
- Kijas, J.M.; Fowler, J.C.; Garbett, C.A. and Thomas, M.R. 1994. 'Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles', *BioTechniques*, 16: 656-60, 62.
- King, T.L.; Eackles, M.S. and Reshetnikov, A.N. 2015. 'Rapid isolation of microsatellite DNAs and identification of polymorphic mitochondrial DNA regions in the fish rotan (*Perccottus glenii*) invading European Russia', *Conservation Genetic Resources*, 7: 363-68.
- Knapik, E.W.; Goodman, A.; Ekker, M.; Chevrette, M.; Delgado, J.; Neuhaus, S.; Shimoda, N.; Driever, W.; Fishman, M.C. and Jacob, H.J. 1998. 'A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*)', *Nature Genetics*, 18: 338-43.
- Kobayashi, M.; Msangi, S.; Batka, M.; Vannuccini, S.; Dey, M.M. and Anderson, J.L. 2015. 'Fish to 2030: The Role and Opportunity for Aquaculture', *Aquaculture Economics & Management*, 19: 282-300.
- Kohlmann, K. and Kersten, P. 2008. 'Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the pike-perch, *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758)', *Molecular Ecology Resources*, 8: 1085-87.
- Kovács, B.; Egedi, S.; Bártfai, R. and Orbán, L. 2001. 'Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*)', *Genetica*, 110: 267-76.
- Kumar, S.; Stecher, G. and Tamura, K. 2016. 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-74.
- Langella, O. 2002. 'Populations 1.2.30'. <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>.
- Lappalainen, A.; Saks, L.; Sustar, M.; Heikinheimo, O.; Jürgens, K.; Kokkonen, E.; Kurkilahti, M.; Verliin, A. and Vetemaa, M. 2016. 'Length at maturity as a potential indicator of fishing pressure effects on coastal pikeperch (*Sander lucioperca*) stocks in the northern Baltic Sea', *Fisheries Research*, 174: 47-57.
- Leclerc, D.; Wirth, T. and Bernatchez, L. 2000. 'Isolation and characterization of microsatellite loci in the yellow perch (*Perca flavescens*), and cross-species amplification within the family Percidae', *Molecular Ecology*, 9: 993-1011.
- Lehoczky, I.; Jeney, Zs.; Magyary, I.; Hancz, Cs. and Kohlmann, K. 2005. 'Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains kept at the live gene bank at Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary', *Aquaculture*, 247: 45-49.
- Lemey, Ph.; Salemi, M. and Vandamme, A.M. 2009. *The Phylogenetic Handbook A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* (Cambridge University Press: Cambridge UK).
- Lench, N.J.; Norris, A.; Bailey, A.; Booth, A. and Markham, A.F. 1996. 'Vectorette PCR isolation of microsatellite repeat sequences using anchored dinucleotide repeat primers', *Nucleic Acids Research*, 24: 2190-91.
- Levinson, G. and Gutman, G.A. 1987. 'Slipped-Strand Mispairing: A Major Mechanism for DNA Sequence Evolution', *Molecular Biology and Evolution*, 4: 203-21.
- Lewontin, R.C. and Kojima, K.I. 1960. 'The evolutionary dynamics of complex polymorphisms', *Evolution*, 14: 458-72.
- Li, L.; Wang, H.P.; Givens, C.; Czesny, S. and Brown, B. 2007. 'Isolation and characterization of microsatellites in yellow perch (*Perca flavescens*)', *Molecular Ecology Notes*, 7: 600-03.
- Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A. and Nevo, E. 2002. 'Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review', *Molecular Ecology*, 11: 2453-65.
- Lipshutz, R.J.; Fodor, S.P.A.; Gingeras, T.R. and Lockhart, D.J. 1999. 'High density synthetic oligonucleotide arrays', *Nature Genetics Supplement*, 21: 20-24.
- Litt, M. and Luty, J.A. 1989. 'A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene', *The American Journal of Human Genetics*, 44: 397-401.

- Liu, Z. 2003. 'A review of catfish genomics: progress and perspectives', *Comparative and Functional Genomics*, 4: 259-65.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F. 2004. 'DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics', *Aquaculture*, 238: 1-37.
- Louati, M.; Kohlmann, K.; Hassine, O.K.B.; Kersten, P.; Poulet, N. and Bahri-Sfar, L. 2016. 'Genetic characterization of introduced Tunisian and French populations of pike-perch (*Sander lucioperca*) by species-specific microsatellites and mitochondrial haplotypes', *Czech J. Anim. Sci.*, 61: 159-71.
- Lunt, D.H.; Hutchinson, W.F. and Carvalho, G.R. 1999. 'An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA)', *Molecular Ecology*, 8: 891-94.
- Magoulas, A. 1998. *Application of molecular markers to aquaculture and broodstock management with special emphasis on microsatellite DNA* (CIHEAM: Genetics and breeding of Mediterranean aquaculture species).
- MAHAL. 2016. "Jelentés a Szövetség működésének 2015. évi eredményeiről." In. Magyar Haltermelők és Halászati Vízterület-hasznosítók Szövetsége.
- MASZ. 2015. "A Magyar Halászati Operatív Program (MAHOP) az ágazat versenyképességének növeléséért és a nemzetközi kapcsolatok fejlesztéséért." In. Magyar Akvakultúra Szövetség.
- Menezes, R.F.; Svenning, J.C.; Lauridsen, T.L.; Borchsenius, F.; Søndergaard, M.; Landkildehus, F. and Jeppesen, E. 2013. 'Variation in fish community structure, richness, and diversity in 56 Danish lakes with contrasting depth, size, and trophic state: does the method matter?', *Hydrobiologia*, 710: 47-59.
- Metzgar, D., Bytof, J., Wills, Ch. 2000. 'Selection Against Frameshift Mutations Limits Microsatellite Expansion in Coding DNA', *Genome Research*, 10: 72-80.
- Mohindra, V.; Singh, R.K.; Palanichamy, M.; Ponniah, A.G. and Lal, K.K. 2007. 'Genetic identification of three species of the genus *Clarias* using allozyme and mitochondrial DNA markers', *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 104-09.
- Moller, D. 1970. 'Transferrin Polymorphism in Atlantic Salmon (*Salmo salar*)', *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 27: 1617-25.
- Müller, T.; Taller, J.; Nyitrai, G.; Kucska, B.; Cernák, I. and Bercsényi, M. . 2004. 'Hybrid of pikeperch, *Sander lucioperca* L. and Volga perch, *S. volgense* (Gmelin)', *Aquaculture Research*, 35: 915-16.
- Na-Nakorn, U. 1999. 'Genetic factors in fish production: a case study of the catfish *Clarias*.' in Saleem Mustafa (ed.), *Genetics in sustainable fisheries management* (Wiley-Blackwell: Fishing News Books Oxford UK).
- Na-Nakorn, U.; Sodsuk, P.; Wongrat, P.; Janekitkarn, S. and Bartley, D.M. . 2002. 'Isozyme variation among four species of the catfish genus *Clarias*', *Journal of Fish Biology*, 60: 1051-57.
- National Center for Biotechnology, Information. 2017. 'African catfish (*Clarias gariepinus*) nucleotide sequences of microsatellites'. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=clarias%20gariepinus%20microsatellite>.
- Naylor, R.L.; Goldberg, R.J.; Primavera, J.H.; Kautsky, N.; Beveridge, M.C.M.; Clay, J.; Folke, C.; Lubchenco, J.; Mooney, H. and Troell, M. 2000. 'Effect of aquaculture on world fish supplies', *Nature*, 405: 1017-24.
- Nazia, A.K. and Siti-Azizah, M.N. 2014. 'Isolation of microsatellites in the bighead catfish, *Clarias macrocephalus* and cross-amplification in selected *Clarias* species', *Molecular Biology Reports*, 41: 1207-13.
- Nei, M. and Tajima, F. 1981. 'Genetic drift and estimation of effective population size', *Genetics*, 98: 625-40.
- Nei, M.; Tajima, F. and Tateno, Y. 1983. 'Accuracy of Estimated Phylogenetic Trees from Molecular Data II. Gene Frequency Data', *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153-70.
- Nesbo, C. L.; Fossheim, T.; Vollestad, L.A. and Jakobsen, K.S. 1999. 'Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization', *Molecular Ecology*, 8: 1387-404.

- Nesbo, C. L.; Magnhagen, C. and Jakobsen, K. S. 1998. 'Genetic differentiation among stationary and anadromous perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea', *Hereditas*, 129: 241-49.
- O'Connell, B.; Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A. 1995. 'Mitochondrial DNA and allozyme variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations in Wales', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 171-78.
- O'Connell, M. and Wright, J.M. 1997. 'Microsatellite DNA in fishes', *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 331-63.
- O'Connell, M.; Skibinski, D.O.F. and Beardmore, J.A. 1996. 'Allozyme and mtDNA divergence between Atlantic salmon populations in North Wales', *Journal of Fish Biology*, 48: 1023-26.
- Okumus, I. and Ciftci, Y. 2003. 'Fish Population Genetics and Molecular Markers: II- Molecular Markers and Their Applications in Fisheries and Aquaculture', *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3: 51-79.
- Olsson, J.; Mo, K.; Florin, A.-B.; Aho, T. and Ryman, N. 2011. 'Genetic population structure of perch *Perca fluviatilis* along the Swedish coast of the Baltic Sea', *Journal of Fish Biology*, 79: 122-37.
- Onara, D.; Taflan, E.; Cocias, S.; Bercsényi, M.; Szücs, R. and Suci, R. 2012. 'Comparative genetic diversity study of two European populations of pikeperch using PCR-RFLP', *Scientific Annals of the Danube Delta Institute*, 18: 203-10.
- Ostrander, E.A.; Jong, P.M.; Rine, J. and Duyk, G. 1992. 'Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 3419-23.
- Paetkau, D. 1999. 'Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol', *BioTechniques*, 26: 690-97.
- Park, L.M. and Moran, P. 1995. 'Developments in molecular genetic techniques in fisheries.' in G.R. and Pitcher Carvalho, T.J. (ed.), *Molecular genetics in fisheries* (Chapman & Hall: London).
- Park, S.D.E. 2001. 'Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection', University of Dublin.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2012. 'GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update', *Bioinformatics*, 28: 2537-39.
- Pérez-Espona, S. 2017. 'Conservation genetics in the European Union – Biases, gaps and future directions', *Biological Conservation*, 209: 130-36.
- Pérez, T.; Albornoz, J. and Dominguez, A. 1998. 'An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature', *Molecular Ecology*, 7: 1347-57.
- Polcar, T.; Blecha, M.; Kristan, J.; Mraz, J.; Velisek, J.; Stara, A.; Stejskal, V.; Malinovskyi, O.; Svacina, P. and Samarin, A.M. 2016. 'Comparison of production efficiency and quality of differently cultured pikeperch (*Sander lucioperca* L.) juveniles as a valuable product for ongrowing culture', *Aquaculture International*, 24: 1607-26.
- Poompuang, S. and Hallerman, E.M. 1997. 'Toward Detection of Quantitative Trait Loci and Marker-Assisted Selection in Fish', *Reviews in Fisheries Science*, 5: 253-77.
- Poulet, N.; Balaesque, P.; Aho, T. and Björklund, M. 2009. 'Genetic structure and dynamics of a small introduced population: the pikeperch, *Sander lucioperca*, in the Rhone delta', *Genetica*, 135: 77-86.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. 'Inference of population structure using multilocus genotype data', *Genetics*, 155: 945-59.
- Pukk, L.; Gross, R.; Vetemaa, M. and Vasemägi, A. 2016. 'Genetic discrimination of brackish and freshwater populations of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) in the Baltic Sea drainage: implications for fish forensics', *Fisheries Research*, 183: 155-64.
- Pukk, L.; Kisand, V.; Ahmad, F.; Gross, R. and Vasemagi, A. 2014. 'Double-restriction-site-associated DNA (dRAD) approach for fast microsatellite marker development in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.)', *Conservation Genetics Resource*, 6: 183-84.
- Pukk, L.; Kuparinen, A.; Jarv, L.; Gross, R. and Vasemagi, A. 2013. 'Genetic and life-history changes associated with fisheries-induced population collapse', *Evolutionary Applications*, 6: 749-60.

- Queller, D.C.; Strassmann, J.E. and Hughes, C.R. 1993. 'Microsatellites and Kinship', *Trends in Ecology & Evolution*, 8: 285-88.
- Rambaut, A. 2009. 'FigTree, version 1.3.1.'. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rassmann, K.; Schlötterer, C. and Tautz, D. 1991. 'Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA-fingerprinting', *Electrophoresis*, 12: 113-18.
- Richardson, T.; Cato, S.; Ramser, J.; Kahl, G. and Weising, K. 1995. 'Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers', *Nucleic Acids Research*, 23: 3798-99.
- Rodríguez-Ramilo, S.T.; Toro, M.A.; Bouza, C.; Hermida, M.; Pardo, B.G.; Cabaleiro, S.; Martínez, P. and Fernández, J. 2011. 'QTL detection for *Aeromonas salmonicida* resistance related traits in turbot (*Scophthalmus maximus*)', *BMC Genomics*, 12: 541.
- Rolli, J.; Girardet, S.; Monachon, C. and Richard, C. 2014. 'Microsatellite Analysis of Perch (*Perca fluviatilis*) and its Genetic Authentication of Geographical Localization', *CHIMIA*, 68: 726-31.
- Rougeot, C.; Jacobs, B.; Kestemont, P. and Melard, Ch. 2002. 'Sex control and sex determinism study in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, by use of hormonally sex-reversed male breeders', *Aquaculture*, 211: 81-89.
- Rousset, F. 2008. 'Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux', *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-06.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. 2000. 'Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.' in S. and Krawetz Misener, S.A. (ed.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Humana Press: Totowa, New Jersey).
- Saisa, M.; Salminen, M.; Koljonen, M.-L. and Ruuhijarvi, J. 2010. 'Coastal and freshwater pikeperch (*Sander lucioperca*) populations differ genetically in the Baltic Sea basin', *Hereditas*, 147: 205-14.
- Salminen, M.; Koljonen, M.-L.; Saisa, M. and Ruuhijarvi, J. 2012. 'Genetic effects of supportive stockings on native pikeperch populations in boreal lakes – three cases, three different outcomes', *Hereditas*, 149: 1-15.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor: New York).
- Schlötterer, C. and Tautz, D. 1992. 'Slippage synthesis of simple sequence DNA', *Nucleic Acids Research*, 20: 211-15.
- Sekar, M.; Suresh, E.; Kumar, N.S.; Nayak, S.K. and Balakrishna, C. 2009. 'Microsatellite DNA markers, a fisheries perspective Part 1: The nature of microsatellites', *Aquaculture Asia Magazine*: 27-29.
- Shimizu, M.; Kosaka, N.; Shimada, T.; Nagahata, T.; Iwasaki, H.; Nagai, H.; Shiba, T. and Emi, M. 2002. 'Universal Fluorescent Labeling (UFL) Method for Automated Microsatellite Analysis', *DNA Research*, 9: 173-78.
- Slatkin, M. 1995. 'A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies', *Genetics*, 139: 457-62.
- Sloss, B.L.; Billington, N. and Burr, B.M. 2004. 'A molecular phylogeny of the Percidae (Teleostei, Perciformes) based on mitochondrial DNA sequence', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 545-62.
- Smouse, P.E.; Whitehead, M.R. and Peakall, R. 2015. 'An informational diversity framework, illustrated with sexually deceptive orchids in early stages of speciation', *Molecular Ecology Resources*, 15: 1375-84.
- Sukkorntong, Ch., Panprommin, D. and Poompuang, S. 2008. 'Sixteen EST-linked microsatellite markers in Günther's walking catfish, *Clarias macrocephalus*', *Molecular Ecology Resources*, 8: 1300-02.
- Sunnucks, P. 2000. 'Efficient genetic markers for population biology', *Tree*, 15: 199-203.
- SustainAqua. 2009. 'Integrated approach for sustainable and healthy freshwater aquaculture', *SustainAqua Handbook - A handbook for sustainable aquaculture*.
- Tachida, H. and Iizukat, M. 1992. 'Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage', *Genetics*, 131: 471-78.

- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. and Kumar, S. 2011. 'Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods', *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731–39.
- Tautz, D. 1989. 'Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers', *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-71.
- Tautz, D.; Trick, M. and Dover, G.A. 1986. 'Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation', *Nature*, 322: 652-56.
- Thornton, P.K. 2010. 'Livestock production: recent trends, future prospects', *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365: 2853-67.
- Tong J. and Chu, K.H. 2002. 'Genome Mapping in Aquatic Animals: Progress and Future Perspectives', *Russian Journal of Genetics*, 38: 612-21.
- Tong, J.G. and Sun, X.W. 2015. 'Genetic and genomic analyses for economically important traits and their applications in molecular breeding of cultured fish', *Science China Life Sciences*.
- Tóth, G.; Gáspári, Z. and Jurka, J. 2000. 'Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis', *Genome Resources*, 10: 967-81.
- Ullmann, A.; Jacob, F. and Monod, J. 1967. 'Characterization by *in vitro* Complementation of a Peptide corresponding to an Operator-proximal Segment of the β -Galactosidase Structural Gene of *Escherichia coli*', *Journal of Molecular Biology*, 24: 339-43.
- Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R. and Leunissen, J.A.M. 2007. 'Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3', *Nucleic Acids Research*, 35: 71-74.
- van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M. and Shipley, P. 2004. 'MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data', *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-38.
- Vandeputte, M.; Rossignol, M. and Pincent, C. 2011. 'From theory to practice: Empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding', *Aquaculture*, 314: 80–86.
- Vidékfejlesztési, Minisztérium. 2013. 'A magyar halgazdálkodási ágazat jelene a Halászati Operatív Program tükrében'. <http://halaszat.kormany.hu/download/e/45/80000/a5-20oldal-HU-VM.PDF>.
- Vignal, A.; Milan, D.; SanCristobal, M. and Eggen, A. 2002. 'A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics', *Genetics Selection Evolution*, 34: 275-305.
- Volckaert, F.A.M. and Hellemans, B. 1999. 'Survival, growth and selection in a communally reared multifactorial cross of African catfish (*Clarias gariepinus*)', *Aquaculture*, 171: 49-64.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; van de Lee, T.; Homes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper M. and Zabeau, M. 1995. 'AFLP: a new technique for DNA fingerprinting', *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-14.
- Wachirachaikarn, A.; Rungsin, W.; Srisapoom, P. and Na-Nakorn, U. 2009. 'Crossing of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), strains based on strain selection using genetic diversity data', *Aquaculture*, 290: 53-60.
- Waples, R.S. and Do, C. 2008. 'LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium', *Molecular Ecology Resources*, 8: 753-56.
- Ward, R.D. 2006. 'The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes', *Fisheries Research*, 80: 9-18.
- Weber, J.L. and May, P.E. 1989. 'Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction', *The American Journal of Human Genetics*, 44: 388-96.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. 'Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure', *Evolution*, 38: 1358-70.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. 'DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers', *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-35.
- Wirgin, I.I. and Waldman, J.R. 1994. 'What DNA Can Do for You', *Fisheries*, 19: 16-27.

- Wirth, T.; Saint-Laurent, R. and Bernatchez, L. 1999. 'Isolation and characterization of microsatellite loci in the walleye (*Stizostedion vitreum*), and cross-species amplification within the family Percidae', *Molecular Ecology*, 8: 1957–69.
- Wright, S. 1949. 'The genetical structure of populations', *Annals of Eugenics*, 15: 323-54.
- Wu, K.; Jones, R.; Danneberger, L. and Scolnik, P.A. 1994. 'Detection of microsatellite polymorphisms without cloning', *Nucleic Acids Research*, 22: 3257-58.
- Wurts, W.A. 2000. 'Sustainable Aquaculture in the Twenty-First Century', *Reviews in Fisheries Science*, 8: 141-50.
- Yang, X.; Qian, L.; Wu, H.; Fan, Z. and Wang, C. 2012. 'Population differentiation, bottleneck and selection of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) at the Asian edge of its natural range', *Biochemical Systematics and Ecology*, 40: 6-12.
- Yang, X.; Wang, C.; Wang, J.; Ma, Y.; Yin, J. and Wu, H. 2009. 'Isolation and characterization of 12 polymorphic microsatellite loci in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.)', *Conservation Genetics Resources*, 1: 229–31.
- Yue, G.H. 2014. 'Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture', *Fish and Fisheries*, 15: 376-96.
- Yue, G.H. and Wang, L. 2017. 'Current status of genome sequencing and its applications in aquaculture', *Aquaculture*, 468: 337-47.
- Yue, G.H.; Kovács, B. and Orbán, L. 2003. 'Microsatellites from *Clarias batrachus* and their polymorphism in seven additional catfish species', *Molecular Ecology Notes*, 3: 465-68.
- Yue, G.H.; Kovács, B. and Orbán, L. 2010. 'A New Problem with Cross-Species Amplification of Microsatellites: Generation of Non-Homologous Products', *Zoological Research*, 31: 131-40.
- Zakes, Z.; Szczepkowski, M.; Partyka, K. and Wunderlich, K. 2013. 'Effect of gonadotropin hormonal stimulation on out-of-season propagation success of different year classes of indoor-reared pikeperch (*Sander lucioperca* (L.))', *Aquaculture International*, 21: 801-10.
- Zane, L.; Bargelloni, L. and Patarnello, T. 2002. 'Strategies for microsatellite isolation: a review', *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- Zardoya, R.; Vollmer, D.M.; Craddock, C.; Streelman, J.T.; Karl, S. and Meyer, A. 1996. 'Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes)', *Proceedings: Biological Sciences*, 263: 1589-98.
- Zarski, D.; Targonska, K.; Kaszubowski, R.; Kestemont, P.; Fontaine, P.; Krejszeff, S.; Kupren, K. and Kucharczyk, D. 2013. 'Effect of different commercial spawning agents and thermal regime on the effectiveness of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), reproduction under controlled conditions', *Aquaculture International*, 21: 819-28.
- Zhan, A.; Wang, Y.; Brown, B. and Wang, H.P. 2009. 'Isolation and Characterization of Novel Microsatellite Markers for Yellow Perch (*Perca flavescens*)', *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 18-27.

M2. Oldatok összetétele

SET-puffer

100 mM	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS)
50 mM	Etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA)
200 mM	Nátrium-klorid (NaCl)
0,5 %	Sodium-dodecyl-sulfate (SDS)

10x TBE-puffer

890 mM	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS)
890 mM	Bórsav
20 mM	Etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA) pH=8,00

TE (Tris-EDTA)

10 mM	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS) pH=8,00
1 mM	Etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA) pH=8,00

TLE (Tris low EDTA)

10 mM	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS) pH=8,00
0,1 mM	Etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA) pH=8,00

20x SSC oldat

3,28 M	Nátrium-klorid (NaCl)
308 mM	tri-nátrium-citrát-2-hidrát

2x Hyb Solution

12x	SSC
0,2%	Sodium-dodecyl-sulfate (SDS)

1x Hyb Solution

6x	SSC
0,1%	Sodium-dodecyl-sulfate (SDS)

Mosó-oldatok (könyvtárkészítés dúsítási lépéseinél)

Mosó oldat A	2x SSC, 0,1% SDS
Mosó-oldat B	1x SSC, 0,1% SDS
Mosó-oldat C	0,5x SSC, 0,1% SDS

LB-tápleves

10 g	Tripton
5 g	Élesztőkivonat
10 g	Nátrium-klorid (NaCl)
1000 ml	végtérfogatra kiegészíteni dH ₂ O-val

LB-táptalaj (2% agar)

10 g	Tripton
5 g	Élesztőkivonat
10 g	Nátrium-klorid (NaCl)
20 g	Bakteriológiai agar
1000 ml	végtérfogatra kiegészíteni dH ₂ O-val

LB-táptalaj további összetevői kék-fehér szelekcióhoz

0,09 mM	X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranoside)
0,08 mM	IPTG (Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside)
1,43 mM	Ampicillin

10x Taq-polimeráz puffer (KCl)

500 mM	Kálium-klorid (KCl)
100 mM	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid (TRIS.HCl; pH=8,00)
1%	TritonX 100

10x Taq-polimeráz puffer [(NH₄)₂SO₄]

750 mM	Trisz-(hidroximetil)-amino-metán-hidroklorid (TRIS.HCl; pH=8,80)
200 mM	Ammónium szulfát [(NH ₄) ₂ SO ₄]
0,1%	Tween 20

M3. Mikroszatellit markerek kimutatásához alkalmazott PCR reakciók összetétele

M3.1 Süllő (*Sander lucioperca*)

A süllő (*Sander lucioperca*) mikroszatelliterek kimutatásához alkalmazott PCR reakciók összetétele: a lókuszek megnevezése, a primer szekvenciák, Taq-polimeráz puffer, primer koncentráció (μM), MgCl_2 -koncentráció (mM), annealing hőmérséklet ($^\circ\text{C}$) és a PCR reakciók ciklusszáma. 1x KCl-puffer összetétele: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100; 1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer összetétele: 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 750 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20.

Lókuszt	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Taq-polimeráz puffer	Primer (μM)	MgCl_2 (mM)	Annealing hőmérséklet ($^\circ\text{C}$)	PCR reakció ciklusszáma
MS 84 SI	F: ACGTGCACACAGGTGTATACTC	R: GTGGAACAGCAGTCAGGGT	1x KCl-puffer	0,40	1,50	59	35
MS146 SI	F: ATCAGAGTTTAGCAGGTCACAAT	R: GGAATTAAGTCCACGCTGTT	1x KCl-puffer	0,30	1,50	55	35
MS150 SI	F: GCAGTGCTATCCTTCTCCAG	R: GGTGACAAGTCGCAGCCT	1x KCl-puffer	0,30	1,50	55	35
MS 192 SI	F: ATGTTGAGAGTCAGGCGTGA	R: CACGAGGTTATTATGATAGACATTA	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 195 SI	F: TGGGTGACAATCCGCTTAG	R: TCAGATGTCATCCTGGTTGC	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 198 SI	F: GCCATTTGGCTTAGGAAAG	R: AGTCTGCTGGTGACCGTGT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 203 SI	F: TGCATGGACAGACGGACA	R: TCGGATTGGACAACAGCAT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 204 SI	F: TTCAATGGGCTGCACTGA	R: AGTAATGCAATTATATCCAGAC	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	3,00	55	45
MS 260 SI	F: CAGAGCTGCTGAGCTTTCTC	R: ACAACCGTCCCCTCTCAC	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 268 SI	F: AAGAGCTGGGTATAGCCAGAT	R: GCTATCTGTAAGGGCTGGATT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 373 SI	F: ATACTTGGATATGCGCTTATTG	R: TGCGATTTCTCATGCTG	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 384 SI	F: CAGACAATTTCACTGTTTCGTAGA	R: AACATCATCATCGTGGTTGTT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 386 SI	F: TGATACCGTGGCAGCAGA	R: CTATGAGATAGCCTAGTAAGGCAA	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 389 SI	F: AGGAGCTGTTCTCTGAACC	R: TGGGTCACGTTCCAACATT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	56	45
MS 395 SI	F: GTCTCAGTTCGTTGGCATAG	R: CATGGGATTACAACCTCTGCTG	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 397 SI	F: TACTTTGCTGCACAATCACG	R: CATCAATCACCTGCCAACA	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	3,00	52	45
MS 404 SI	F: CATTGATGCCTGTAGCAAGTT	R: CTCAGTAATCTCCAGGGAGC	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 410 SI	F: TTACTGCTCAGCTGGTCCC	R: GGATCAGTGTAGGCACGGTA	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 412 SI	F: ACAGGAGTTATGAGTCAGGCTT	R: GACCAGGAGGGTATCAGCA	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45
MS 416 SI	F: CATGAGCCACATTAGACACAA	R: ACCAATGCCTTTAGGATAGTG	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	3,00	55	45
MS 417 SI	F: CACGCACCTGTCTCTCTGT	R: GACAACAGCCACATCAACG	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,10	2,00	55	45

<i>MS 420 SI</i>	F: GCTGTTTCACAGGTCCTCACT	R: TCCCAGTCGCTGCTTGAT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45
<i>MS 422 SI</i>	F: TGATTGAAAAGACCTGGCAC	R: TCTGCTGTGTCTTGAACCCT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45
<i>MS 423 SI</i>	F: GAGATCCATCGGACTAAAGGT	R: GAGTAGGGCAGTTGCTTCAA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45
<i>MS 424 SI</i>	F: AGCTAATTTGAGGATGTTATCATG	R: GTGTAGTAGTGAGGTGCGTGTA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45
<i>MS 673 SI</i>	F: CAATGTGTCTGAATCTGTCTGTT	R: TCATACTTTGGTCTGCTGGTC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45
<i>MS 682 SI</i>	F: TTGCTAACACCGTGGCTCT	R: AGCAGTGATTGACACGCAGT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45
<i>MS 686 SI</i>	F: ATTATGGTGATTTATTGAGGCA	R: AGTGATGGGTGGTAATGGAG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,50	55	45
<i>MS 687 SI</i>	F: TTAGGACTTCTTGAGGTCGAA	R: ATGCGCTGTTCTGAGCAG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,50	56	45
<i>MS 698 SI</i>	F: AATGTGGCGCTCATTAG	R: CCAGCTGAGTGCCGTTACT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,50	55	45
<i>MS 701 SI</i>	F: CAGAATCACGCAAGCACTC	R: AGTTGTGCGATGGACTAATGT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45
<i>MS 703 SI</i>	F: GGTC AAGTAAAGAGGTCAACATT	R: AAGCAACAGCAGAGGATGAG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45
<i>MS 704 SI</i>	F: TGTTCTGGTTTATCTGTTTTGAA	R: TCTTCGCTGCTTATAGTCTGC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45
<i>MS 707 SI</i>	F: CCATGACAATGTGCCTATGAT	R: TGACCTGATAGAGGTTAATACCAG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,10	2,00	55	45

M3.2 Sügér (*Perca fluviatilis*)

A sügér (*Perca fluviatilis*) mikroszatellitiek kimutatásához alkalmazott PCR reakciók összetétele: a lókuszek megnevezése, a primer szekvenciák, Taq-polimeráz puffere, primer koncentráció (μM), MgCl_2 -koncentráció (mM), annealing hőmérséklet ($^\circ\text{C}$) és a PCR reakciók ciklusszáma. $1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer összetétele: 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 750 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20.

Lókusz	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Taq-polimeráz puffer	Primer (μM)	MgCl_2 (mM)	Annealing hőmérséklet ($^\circ\text{C}$)	PCR reakció ciklusszáma
<i>MS 426 Pf</i>	F: ACTGTATCTATGCTGAAACGAAGT	R: TGCTATGAATATCTGTGCCTCTA	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 427 Pf</i>	F: GCTGAGTTACAGTTTAATGTATTTGA	R: ACAGCAGATTAGTATGGAGCAG	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 428 Pf</i>	F: TATTAATCAAGTGCCTGAAAGCT	R: GAGTTGTAATGTAGCATCACGC	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	3,50	55	45
<i>MS 432 Pf</i>	F: CTCAATAACCGACCACAGACC	R: TGTGGATGCACATGCACC	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,50	55	45
<i>MS 439 Pf</i>	F: TCTGCCTGTCTCCCACCT	R: TTAAATCCATGCGACAACCTG	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	3,00	55	45
<i>MS 441 Pf</i>	F: CGTGCTGTTCTGATAAAATACAT	R: TGTGTGAAGATAGGTCTGGCT	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,50	55	45
<i>MS 449 Pf</i>	F: CACAGTGACATTTGCTCCTCT	R: GATATTGACCTCATCTTCCTCAG	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	1,50	55	45
<i>MS 450 Pf</i>	F: CAGAGGCATCATGGAGAGC	R: CTCGGGCTCACAGTGACAT	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	1,50	55	45
<i>MS 455 Pf</i>	F: GCATCGGTTAGATATTGGGATA	R: AATGGTCCAGGGAATGAATC	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	54	45
<i>MS 464 Pf</i>	F: GCTCAACAAGGCTTTACAT	R: CACCAGGAAATGTTGCTTATC	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 467 Pf</i>	F: GTCCACCACAGCTTTACCAG	R: CCAACAGCCCACAATGC	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 484 Pf</i>	F: TCTTATAGAAGCGGTGGTTGA	R: CGTGACACCGTTCTACTGC	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 500 Pf</i>	F: AGACTATCGTGCTCCTGAGGT	R: CTAATTATAAATGACCTCCTCTGC	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	3,00	52	45
<i>MS 716 Pf</i>	F: ATGTATTTAGAGGCAAGAAGGC	R: TCAGTTTCAGGTCTGCCATC	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,50	56	45
<i>MS 719 Pf</i>	F: AACACATCTTCACAAGGATTCC	R: AGCCTGTGGTTGATTGATGA	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 723 Pf</i>	F: AGCCCATTTGAATTAACCTGA	R: ATTGCGTGTTCATTTACCCT	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 725 Pf</i>	F: TCAGTTCGTCAACACTAATGGT	R: AGCAACCAACAATCACAATAAG	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 726 Pf</i>	F: TACTCATGCTACTAATGCTCATGT	R: TATGTATTGGCCTGTGTATTGTAT	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	3,00	55	45
<i>MS 728 Pf</i>	F: GCCTGGTCGGATCTACTTG	R: TGATATAGCCTCTCAGCTGGT	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 729 Pf</i>	F: CTCTGGGCAGTGTGTGTGG	R: GCTGACCCCTCACGATGA	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	1,50	55	45
<i>MS 730 Pf</i>	F: TCACCTCCTACTTTACTTCACT	R: AATGGTCAGCAAGGAAGTCA	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 732 Pf</i>	F: AGAACTGGGCTCAAGTGTC	R: TCAACATCTGTCAAACAGGTC	$1\text{ x }(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45

<i>MS 737 Pf</i>	F: ACTGACCATCCACTCCGTG	R: CAAGGGGCTTATGGGTGT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 739 Pf</i>	F: AGATCAATCGGTCAATGAGG	R: GAGAGACTCCATCTCCACAAC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 745 Pf</i>	F: TGGCACTCTGAGTGGATCAC	R: CTTGTTCCATTATTCTTTATCAT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45

M3.3 Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*)

Az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) mikroszatellitek kimutatásához alkalmazott PCR reakciók összetétele: a lókuszek megnevezése, a primer szekvenciák, Taq-polimeráz puffere, primer koncentráció (μM), MgCl_2 -koncentráció (mM), annealing hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$) és a PCR reakciók ciklusszáma. 1x KCl-puffer összetétele: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100; 1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer összetétele: 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 750 mM Tris-HCl, 0,1% Tween 20.

Lókuszt	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	PCR puffer	Primer (μM)	MgCl_2 (mM)	Annealing hőmérséklet ($^{\circ}\text{C}$)	PCR reakció ciklusszáma
<i>MS 2 Cg</i>	F: AGCAGGAAAACGGGTCAC	R: ATGGTTCAGCTGTAGTGTGG	1x KCl-puffer	0,26	1,50	59	35
<i>MS 3 Cg</i>	F: CGCCCTACCTGTAACCTGT	R: CGAGTTTCCAGGTAGAGCAG	1x KCl-puffer	0,26	1,50	59	35
<i>MS 10 Cg</i>	F: GTCATGCTGGGAGAACAAGA	R: TGCATGATAGGTGAAAGGT	1x KCl-puffer	0,26	1,50	59	35
<i>MS 40 Cg</i>	F: AGAACTTGACTCGGGTGCA	R: CAAACGGCACCTCAAACA	1x KCl-puffer	0,26	1,50	59	35
<i>MS 122 Cg/A</i>	F: ACCTTCAGACATACTGAGGCTT	R: GAGGATCAGATTATTGGATTGAT	1x KCl-puffer	0,26	1,50	56	35
<i>MS 122 Cg/B</i>	F: GACCTTCACTTTCCTCCTTCT	R: TGCTAATGTGATGCCAATGT	1x KCl-puffer	0,26	1,50	55	35
<i>MS 132 Cg</i>	F: CAGAAATTCTGCAGAATTGTGT	R: CGAGTTACCCTGGCAGATC	1x KCl-puffer	0,26	1,50	55	35
<i>MS 175 Cg</i>	F: CCTGAAGAAGAAATCTCAGATAAGT	R: ATCAGACTGAGGATGAGGTTCA	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 214 Cg</i>	F: CCTGCATTATCCCTTTGAC	R: AATAACAGACTATGTTGAATTAATGG	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 236 Cg</i>	F: CATCCTTTGTTTATGGCTTGTT	R: TCATGCTTTAGAGTCTCATCTCAC	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 243 Cg</i>	F: TGTGTGAAGGTTTATGTAACGAT	R: TCAATCCTGCCCTAGACCTA	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 285 Cg</i>	F: CAAGTAATAAGGTGAAATGAGACTTT	R: CAAAGGAAGTGGGGAAGTGT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 287 Cg</i>	F: GGAATGTTTGATGAATGTGA	R: TGCCTTGGATATTGTTTGCT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 288 Cg</i>	F: GCTGTCGCTATGACTTACCT	R: GTCCTGTGGATGGCACTTC	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 289 Cg</i>	F: TACAGCATCTCTGAGGGACG	R: CTGTCACCTTTAGTGAATTCACAC	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 290 Cg</i>	F: ACATACATCCATGGTGACTGC	R: AACTTCACACATTTGAAGGAGAT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 294 Cg</i>	F: CAGCTGTGCGATGTATGACCTG	R: GACCTGAAGGAGCCTGTCTG	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 298 Cg</i>	F: CCGACCATCAGGAGACAGA	R: CGAGACTCGCCGTCCTC	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 299 Cg</i>	F: ATGTGTGCAAGCTTACAGCTC	R: GCTATATCGCTCACTGATACCA	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 305 Cg</i>	F: TCGTTTTCAGGGCTTCG	R: CTGCAGGGAATCATCTCTGT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,50	55	45
<i>MS 307 Cg</i>	F: TACATCTCTGTTTAGCAAAGTGG	R: TGCGTGCGTAAAGCATCT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 308 Cg</i>	F: GGAGTGTAACACGTTAGAGG	R: CTGGAGTATGAATCTCTCATCT	1x $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -puffer	0,13	2,00	55	45

<i>MS 312 Cg</i>	F: TTGTGCACTGCAAGCGAT	R: AGTCAATGCATTTGGACAGC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 316 Cg</i>	F: GTGTGTGCGCTTGTGTGG	R: CGGAGAAGTGCCGTAGCT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 321 Cg</i>	F: TGTGGAAGATGGAACAATAGAG	R: AGTCTGTAGGAAATTCACACTGTAT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 330 Cg</i>	F: TACCTAAGAGGAACTGCAATGC	R: TCTCAGGGACATTGTCTGAATAA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 332 Cg</i>	F: CTCCCTCTTCCTTTGCTACTC	R: ATGGTGCTCAGCAGTCATCT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 336 Cg</i>	F: GCAGATAATCCGTTCCAGC	R: CCAAGTCCTGCATACTGTGTGT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 337 Cg</i>	F: TGGTCAGACGAGGAACACTT	R: CACACTAACACAACCACATATTCA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 339 Cg</i>	F: GCTCGATTCTGATTTACAGG	R: GCTGCTCCTCAGTCCAAGT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 341 Cg</i>	F: GAGTCGTGCCGTTATCTCC	R: GCTCAACCTGCTGTTACTCAA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 344 Cg</i>	F: ACAGACATGAGACTACGGTATGTAT	R: CATGTGTTGTTCTCCAGTCAATA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 346 Cg</i>	F: CAGGGCTACACAGCGTCG	R: GATTCATCAACCACATTGCTCTC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 350 Cg</i>	F: GTCGTCGTATGCTGAATAATGT	R: TCCACTTCTAGTAGCACTCTTCC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	3,00	53	45
<i>MS 352 Cg</i>	F: TGGTTGAGATCGAGGTTGG	R: TGACTCAGACTCGGAGACCTAC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 354 Cg</i>	F: GCAGACGGGAGCGTGA	R: GCCGCTCCTTTATCACATT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 355 Cg</i>	F: CTCAGGGCACTCGGAACA	R: CCTTAAACCACCACCTACTG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	3,00	55	45
<i>MS 357 Cg</i>	F: GCGTGCCAAACGGAGA	R: CATTGCCAGAATCTCTTAAGTTC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 367 Cg</i>	F: TGCCAAACCATCTCCGA	R: CTCCGGTTTCTCCCAC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	58	35
<i>MS 370 Cg</i>	F: AGGTCCACAGGTCACATCAG	R: TCTATCCCTACCGCCAAGA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 638 Cg</i>	F: CCAGTGAGTGGCAGGAGTG	R: TCATTACTACACACCACATCACAA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 639 Cg</i>	F: CAGCTTTGGCTCGGTCA	R: AACACGTTCAAGCGGTAGTC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 643 Cg</i>	F: CTGTCATCTTCACTGGTCCAT	R: AGAAGGACATTACAGTAGGTCAAG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 644 Cg</i>	F: GATGTAATACGGAACAACACCAG	R: CACAGCCGTGTTCTCTTGC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 645 Cg</i>	F: CTGTTTACTCTAACACTGTGACCAC	R: CACGGTGTCCAATGATGTG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 647 Cg</i>	F: GGTGACACCACCTGAGAA	R: TCCAGCTTTTAGCAAGTGTTAG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 649 Cg</i>	F: ATGATTGACCAGTCAAATCGA	R: AGTTCGTCCCATAATGGCA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 651 Cg</i>	F: AGAATAGCTGAGGAGTGAGGAG	R: CATTGTGCTTCGGCTGAT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45
<i>MS 652 Cg</i>	F: ATCAACATCACCCGCTCAC	R: ACCTCATCAATGCCACTGTC	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	58	35
<i>MS 653 Cg</i>	F: TCTATTTGATTTAGGAAGCAGACT	R: GATGCGGTTTGCCTGAT	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	3,00	55	45
<i>MS 657 Cg</i>	F: AGGAAGTAGAGTTGTTATGGCAG	R: GACATGCCACAGACTGAAG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	54	45
<i>MS 661 Cg</i>	F: TTGGGTTTATCCGTGGTTC	R: GAGATGCTGGTGATGGTGAG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	3,00	55	45
<i>MS 663 Cg</i>	F: TCAATCTCAGAGAGGAACGACT	R: TGATGGGAGCGATGTACG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45

<i>MS 665 Cg</i>	F: TGGACAGATGGGGTTAGGTA	R: GGTCTCTTTGCTGCTGCTTA	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	58	35
<i>MS 668 Cg</i>	F: ATTACATCAGTACAAGTGCCAACT	R: TGTGTAACACTCTGTATAGCGAG	1x (NH ₄) ₂ SO ₄ -puffer	0,13	2,00	55	45

M4. Süllő (*Sander lucioperca*) mikroszatellit marker szettek multiplex PCR-alapú analízishez

A várható allél mérettartományt 10, a Duna-vízgyűjtő területről származó populáció vizsgálata alapján határoztuk meg. A táblázatban felsorolt méretek tartalmazzák a 17 bázispár hosszú „tail”-szekvencia méretét is.

A szett		B szett		C szett		D szett	
Mikroszatellit marker	Várható allél mérettartomány (bázispár)	Mikroszatellit marker	Várható allél mérettartomány (bázispár)	Mikroszatellit marker	Várható allél mérettartomány (bázispár)	Mikroszatellit marker	Várható allél mérettartomány (bázispár)
<i>MS 420 SI</i>	141-161	<i>MS 703 SI</i>	145-158	<i>MS 423 SI</i>	161-180	<i>MS 707 SI</i>	123-127
<i>MS 386 SI</i>	186-246	<i>MS 424 SI</i>	169-198	<i>MS 192 SI</i>	207-246	<i>MS 422 SI</i>	140-161
<i>MS 701 SI</i>	270-304	<i>MS 682 SI</i>	221-248	<i>MS 704 SI</i>	253-263	<i>MS 373 SI</i>	186-217
<i>MS 404 SI</i>	347-376	<i>MS 417 SI</i>	277-298	<i>MS 384 SI</i>	274-295	<i>MS 395 SI</i>	234-270
Fluoreszcens festék	PET	Fluoreszcens festék	NED	Fluoreszcens festék	FAM	Fluoreszcens festék	VIC

M5. Süllő (*Sander lucioperca*) multiplex PCR reakciókörülmények

M5.1 Süllő multiplex PCR reakciók összetételei

A-szett

Taq-polimeráz puffer [(NH ₄) ₂ SO ₄]	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,4 mM
<i>MS 420 Sl</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
<i>MS 386 Sl</i> forward és reverse primer	132 nM - 132 nM
<i>MS 701 Sl</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
<i>MS 404 Sl</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
PET-jelölt tail primer	264 nM
Taq-polimeráz	0,2 U/μl
DNS templát	150 ng

B-szett

Taq-polimeráz puffer [(NH ₄) ₂ SO ₄]	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,4 mM
<i>MS 703 Sl</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
<i>MS 424 Sl</i> forward és reverse primer	105,6 nM – 105,6 nM
<i>MS 682 Sl</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
<i>MS 417 Sl</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
NED-jelölt tail primer	264 nM
Taq-polimeráz	0,2 U/μl
DNS templát	150 ng

C-szett

Taq-polimeráz puffer [(NH ₄) ₂ SO ₄]	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,4 mM
<i>MS 423 Sl</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
<i>MS 192 Sl</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
<i>MS 704 Sl</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
<i>MS 384 Sl</i> forward és reverse primer	105,6 nM – 105,6 nM
FAM-jelölt tail primer	264 nM
Taq-polimeráz	0,2 U/μl
DNS templát	150 ng

D-szett

Taq-polimeráz puffer [(NH ₄) ₂ SO ₄]	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,4 mM
<i>MS 707 SI</i> forward és reverse primer	105,6 nM – 105,6 nM
<i>MS 422 SI</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
<i>MS 373 SI</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
<i>MS 395 SI</i> forward és reverse primer	52,8 nM – 52,8 nM
VIC-jelölt tail primer	264 nM
Taq-polimeráz	0,2 U/μl
DNS templát	150 ng

M5.1 Süllő multiplex PCR reakciók hőmérsékleti profilja

Multiplex PCR reakcióhoz alkalmazott „touch-down” hőmérsékleti profil

Hőmérséklet	Idő	Ciklusszám
95 °C	2 perc	1x
95 °C	15 másodperc	2x
58 °C	1 perc	
72 °C	2 perc	
95 °C	15 másodperc	2x
57,5 °C	1 perc	
72 °C	2 perc	
95 °C	15 másodperc	2x
57 °C	1 perc	
72 °C	2 perc	
95 °C	15 másodperc	2x
56,5 °C	1 perc	
72 °C	2 perc	
95 °C	15 másodperc	2x
56 °C	20 másodperc	
72 °C	40 másodperc	
95 °C	15 másodperc	2x
55,5 °C	20 másodperc	
72 °C	40 másodperc	
95 °C	15 másodperc	15x
55 °C	20 másodperc	
72 °C	40 másodperc	
95 °C	15 másodperc	15x
54,5 °C	20 másodperc	
72 °C	40 másodperc	
72 °C	5 perc	1x

M6. Süllő (*Sander lucioperca*) mikroszatellit markerek jellemzése

M6.1 Süllő mikroszatellit markerek általános jellemzése

Jellemzés az klónozott mikroszatellit allél ismétlődést tartalmazó régiójának szekvenciája, a klónozott mikroszatellit allél mérete, a vizsgált egyedszám, a detektált allélok száma és mérettartománya, valamint a várt és megfigyelt heterozigotizáció értékek, a HWE-teszt, a PIC (Polymorph Information Content), továbbá a génbanki azonosítók tekintetében.

Mikroszatellit marker	A klónozott mikroszatellit allél ismétlődést tartalmazó régiójának szekvenciája	Klónozott mikroszatellit allél mérete (bázispár)	Allél mérettartomány (bázispár)	Vizsgált egyedszám	Detektált allélok száma	H _E	H _O	HWE	PIC	Génbanki azonosító
<i>MS 84 SI</i>	(CA) ₂₂	136	114-181	168	19	0,860	0,685	*	0,843	KX375356
<i>MS146 SI</i>	(CA) ₇	138	116-144	293	5	0,086	0,068	***	0,084	KX375357
<i>MS150 SI</i>	(CA) ₈	117	112-117	293	3	0,107	0,079	ns	0,101	KX375358
<i>MS 192 SI[#]</i>	(TG) ₁₉	201	190-229	376	17	lsd. alább				KX375359
<i>MS 195 SI[#]</i>	(AC) ₁₇	107	94-106	376	7	lsd. alább				KX375360
<i>MS 198 SI[#]</i>	(CA) ₃₁	214	514-527	376	3	lsd. alább				KX375361
<i>MS 203 SI[#]</i>	(AC) ₁₆	144	133-144	376	7	lsd. alább				KX375362
<i>MS 204 SI</i>	(TG) ₂₂	151	131-162	8	7	0,839	0,683	**	0,787	KX375363
<i>MS 260 SI[#]</i>	(TG) ₂₆	184	165-208	376	20	lsd. alább				KX375364
<i>MS 268 SI[#]</i>	(CA) ₉	225	223-227	376	3	lsd. alább				KX375365
<i>MS 373 SI</i>	(AC) ₁₆	171	169-200	8	9	0,867	1,000	ns	0,844	KX375366
<i>MS 384 SI</i>	(AC) ₉ N ₁₀ (AC) ₁₉ N ₁₈ (AC) ₁₁	258	257-278	8	5	0,917	0,750	ns	0,641	KX375367
<i>MS 386 SI</i>	(AC) ₃₅	204	169-229	8	9	0,725	0,500	ns	0,799	KX375368
<i>MS 389 SI</i>	(AC) ₂₇	228	208-242	8	6	0,879	0,857	ns	0,733	KX375369

<i>MS 395 SI</i>	(AC) ₂₅	232	217-253	8	7	0,817	1,000	ns	0,725	KX375370
<i>MS 397 SI[#]</i>	(CT) ₈ N ₁₉ (CA) ₁₅	160	155-173	376	7	lsd. alább				KX375371
<i>MS 404 SI</i>	(TG) ₂₃	324	330-359	8	5	0,792	0,375	*	0,701	KX375372
<i>MS 410 SI</i>	(AC) ₂₃	247	240-263	8	6	0,842	0,750	ns	0,759	KX375373
<i>MS 412 SI</i>	(TG) ₂₄ (TC) ₃₈	223	184-267	8	10	0,942	0,750	ns	0,871	KX375374
<i>MS 416 SI</i>	(AC) ₁₅	120	91-123	8	6	0,747	0,857	ns	0,664	KX375375
<i>MS 417 SI</i>	(CA) ₂₀ N ₃₄ (AC) ₅	259	260-281	8	7	0,825	0,750	ns	0,741	KX375376
<i>MS 420 SI</i>	(AC) ₁₃	137	124-144	8	5	0,683	0,875	ns	0,584	KX375377
<i>MS 422 SI</i>	(TG) ₂₀ N ₁₄ (GT) ₁₆	130	123-144	8	4	0,725	0,250	**	0,624	KX375378
<i>MS 423 SI</i>	(AC) ₂₀	153	144-163	8	5	0,775	0,375	**	0,682	KX375379
<i>MS 424 SI</i>	(TG) ₁₄ N(GT) ₁₆	162	152-181	8	10	0,942	0,875	ns	0,871	KX375380
<i>MS 673 SI</i>	(TG) ₃₀	213	212-220	8	3	0,692	0,375	ns	0,575	KX375381
<i>MS 682 SI</i>	(TG) ₃₀	213	204-231	8	6	0,833	0,625	ns	0,748	KX375382
<i>MS 686 SI</i>	(TG) ₃₅	107	107-114	8	3	0,575	0,500	ns	0,447	KX375383
<i>MS 687 SI</i>	(CA) ₂₇	167	135-143	8	3	0,658	1,000	ns	0,544	KX375384
<i>MS 698 SI</i>	(TG) ₁₈	182	165-201	8	5	0,675	0,625	ns	0,599	KX375385
<i>MS 701 SI</i>	(AC) ₂₅ N(CA) ₁₁	273	253-287	8	7	0,867	0,875	ns	0,787	KX375386
<i>MS 703 SI</i>	(TG) ₁₆	133	128-141	8	4	0,692	0,750	ns	0,582	KX375387
<i>MS 704 SI</i>	(GT) ₂₂	234	236-246	8	5	0,808	0,625	ns	0,717	KX375388
<i>MS 707 SI</i>	(AC) ₁₇	114	106-110	8	3	0,575	0,625	ns	0,482	KX375389

H_E: várt heterozigotitás, H_o: megfigyelt heterozigotitás, HWE: a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés szignifikanciája (P>0,05 ns – a különbség nem szignifikáns; * 0,01<P<0,05, ** 0,001<P<0,01, *** P<0,001 - a különbség szignifikáns); PIC: Polymorphic Information Content. # A populációgenetikai analízisben alkalmazott markerek.

M6.2 Populációgenetikai analízis során alkalmazott süllő mikroszatellit markerek jellemzése

Vizsgált állomány	Mikroszatellit marker	Detektált allélok száma	Allél mérettartomány (bázispár)	Ar	Gén-diverzitás	PIC	H _E	H _o	HWE
<u>Németország</u>									
Felső-Duna (Ge; N=14)	<i>MS 192 Sl</i>	2	197-203	2,000	0,473	0,354	0,476	0,571	ns
	<i>MS 195 Sl</i>	3	98-102	2,926	0,203	0,186	0,204	0,214	ns
	<i>MS 198 Sl</i>	3	514-527	3,000	0,657	0,559	0,662	0,769	ns
	<i>MS 203 Sl</i>	2	135-139	2,000	0,522	0,375	0,519	0,429	ns
	<i>MS 260 Sl</i>	7	171-202	6,857	0,846	0,785	0,841	0,714	ns
	<i>MS 268 Sl</i>	2	223-225	1,997	0,137	0,124	0,138	0,143	ns
	<i>MS 397 Sl</i>	4	161-169	4,000	0,731	0,648	0,728	0,643	ns
<u>Magyarország</u>									
Kisbajcs (Kb; N=78)	<i>MS 192 Sl</i>	12	195-229	8,167	0,817	0,793	0,817	0,855	**
	<i>MS 195 Sl</i>	6	94-104	4,393	0,606	0,558	0,607	0,654	**
	<i>MS 198 Sl</i>	2	514-519	1,931	0,164	0,150	0,164	0,179	ns
	<i>MS 203 Sl</i>	5	133-141	3,417	0,543	0,476	0,543	0,526	ns
	<i>MS 260 Sl</i>	8	165-199	5,575	0,731	0,688	0,732	0,844	**
	<i>MS 268 Sl</i>	2	223-225	2,000	0,493	0,370	0,493	0,474	ns
	<i>MS 397 Sl</i>	3	161-165	2,343	0,146	0,140	0,146	0,103	**
Győr (Gy; N=21)	<i>MS 192 Sl</i>	8	199-229	7,157	0,832	0,787	0,832	0,810	**
	<i>MS 195 Sl</i>	5	96-104	4,233	0,592	0,521	0,588	0,429	***
	<i>MS 198 Sl</i>	1	519	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	(-)

	<i>MS 203 SI</i>	4	135-144	3,614	0,561	0,490	0,559	0,476	*
	<i>MS 260 SI</i>	7	169-204	5,808	0,738	0,676	0,738	0,714	ns
	<i>MS 268 SI</i>	2	223-225	1,951	0,136	0,124	0,136	0,143	ns
	<i>MS 397 SI</i>	3	155-165	2,619	0,324	0,279	0,324	0,333	ns
Balaton (Ba; N=60)	<i>MS 192 SI</i>	7	197-223	5,482	0,732	0,684	0,733	0,800	*
	<i>MS 195 SI</i>	5	98-106	4,182	0,699	0,639	0,698	0,667	ns
	<i>MS 198 SI</i>	2	514-519	1,629	0,065	0,062	0,065	0,067	ns
	<i>MS 203 SI</i>	4	135-143	3,503	0,324	0,306	0,324	0,333	ns
	<i>MS 260 SI</i>	9	179-204	5,337	0,713	0,662	0,713	0,700	ns
	<i>MS 268 SI</i>	2	223-225	2,000	0,500	0,372	0,499	0,433	ns
	<i>MS 397 SI</i>	3	161-165	2,328	0,198	0,182	0,198	0,150	**
Dalmand (Da; N=46)	<i>MS 192 SI</i>	8	197-225	6,238	0,823	0,784	0,821	0,630	***
	<i>MS 195 SI</i>	4	98-104	3,849	0,632	0,557	0,630	0,478	**
	<i>MS 198 SI</i>	2	514-519	1,991	0,245	0,213	0,245	0,239	ns
	<i>MS 203 SI</i>	4	135-143	3,445	0,546	0,477	0,544	0,391	*
	<i>MS 260 SI</i>	10	169-204	5,962	0,601	0,567	0,601	0,609	ns
	<i>MS 268 SI</i>	3	223-227	2,283	0,516	0,391	0,516	0,522	ns
	<i>MS 397 SI</i>	2	163-165	1,742	0,084	0,080	0,084	0,087	ns
Attala (At; N=21)	<i>MS 192 SI</i>	6	199-227	5,854	0,813	0,765	0,814	0,857	ns
	<i>MS 195 SI</i>	4	96-102	3,721	0,592	0,493	0,590	0,524	ns
	<i>MS 198 SI</i>	2	514-519	2,000	0,374	0,297	0,372	0,286	ns
	<i>MS 203 SI</i>	4	135-141	3,603	0,533	0,464	0,533	0,524	ns
	<i>MS 260 SI</i>	4	183-204	3,570	0,505	0,437	0,505	0,524	**
	<i>MS 268 SI</i>	2	223-225	2,000	0,507	0,373	0,508	0,524	ns
	<i>MS 397 SI</i>	4	163-169	3,756	0,358	0,326	0,354	0,200	*

Akasztó (Ak; N=21)	<i>MS 192 SI</i>	8	199-229	6,91	0,781	0,727	0,778	0,667	*
	<i>MS 195 SI</i>	5	96-104	4,767	0,747	0,669	0,739	0,400	***
	<i>MS 198 SI</i>	2	514-519	1,995	0,217	0,188	0,215	0,143	ns
	<i>MS 203 SI</i>	2	139-141	1,951	0,138	0,124	0,136	0,048	ns
	<i>MS 260 SI</i>	7	167-204	6,471	0,771	0,723	0,772	0,810	ns
	<i>MS 268 SI</i>	2	223-225	2,000	0,514	0,375	0,512	0,429	ns
	<i>MS 397 SI</i>	3	163-169	2,619	0,468	0,373	0,470	0,571	ns
Nyíregyháza (Ny; N=47)	<i>MS 192 SI</i>	9	195-219	7,943	0,858	0,830	0,856	0,674	*
	<i>MS 195 SI</i>	4	94-100	3,276	0,664	0,588	0,666	0,766	ns
	<i>MS 198 SI</i>	2	514-519	1,479	0,042	0,041	0,042	0,043	ns
	<i>MS 203 SI</i>	2	137-139	2,000	0,351	0,287	0,351	0,319	ns
	<i>MS 260 SI</i>	4	179-199	3,456	0,536	0,475	0,534	0,404	ns
	<i>MS 268 SI</i>	2	223-225	2,000	0,403	0,320	0,404	0,553	**
	<i>MS 397 SI</i>	4	161-169	2,755	0,410	0,346	0,410	0,447	ns
Románia Temesvár (Ti; N=20)	<i>MS 192 SI</i>	4	201-225	3,999	0,732	0,667	0,735	0,850	**
	<i>MS 195 SI</i>	2	102-104	2,000	0,513	0,375	0,514	0,556	ns
	<i>MS 198 SI</i>	1	519	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	(-)
	<i>MS 203 SI</i>	3	137-141	2,650	0,536	0,409	0,535	0,500	ns
	<i>MS 260 SI</i>	2	169-185	2,000	0,511	0,374	0,512	0,550	ns
	<i>MS 268 SI</i>	2	223-225	2,000	0,468	0,351	0,467	0,400	ns
	<i>MS 397 SI</i>	4	163-173	3,715	0,406	0,359	0,401	0,235	*
Duna-delta torkolat (De; N=48)	<i>MS 192 SI</i>	6	190-207	5,829	0,797	0,760	0,798	0,875	ns
	<i>MS 195 SI</i>	5	98-106	4,801	0,648	0,605	0,647	0,604	ns

	<i>MS 198 SI</i>	2	519-527	2,000	0,384	0,305	0,380	0,111	***
	<i>MS 203 SI</i>	3	135-139	3,000	0,648	0,568	0,648	0,625	ns
	<i>MS 260 SI</i>	9	169-208	7,165	0,790	0,760	0,790	0,792	ns
	<i>MS 268 SI</i>	3	223-227	2,983	0,607	0,516	0,608	0,667	ns
	<i>MS 397 SI</i>	2	161-163	1,996	0,281	0,239	0,280	0,292	ns

N: vizsgált egyedek száma; detektált allélok száma és mérettartománya; allélgazdagság (Ar); géndiverzitás; Polymorphic Information Content (PIC); várt heterozigotitás (H_E); megfigyelt heterozigotitás (H_O); Hardy-Weinberg Egyensúlytól való eltérés szignifikanciája (HWE). $P > 0,5$, nem szignifikáns az eltérés a Hardy-Weinberg Egyensúlytól (ns); * $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$ szignifikáns az eltérés az Hardy-Weinberg Egyensúlytól. (-) Az egyes markerek monomorfnek bizonyultak az adott populációban.

M7. Süllő (*Sander lucioperca*) populációgenetikai analízisben alkalmazott mikroszatellit markerekeinek jellemzése – null-allél jelenlétének valószínűsége, allél kiesés valószínűsége, valamint genotipizálási hibák valószínűsége alapján

Vizsgált állomány	Mikroszatellit marker	Null-allél valószínűsége	Allél kiesés valószínűsége	Genotipizálási hiba valószínűsége
<u>Németország</u>				
Felső Duna (Ge)	MS 192 SI	nem	nem	nem
	MS 195 SI	nem	nem	nem
	MS 198 SI	nem	nem	nem
	MS 203 SI	nem	nem	nem
	MS 260 SI	nem	nem	nem
	MS 268 SI	nem	nem	nem
	MS 397 SI	nem	nem	nem
<u>Magyarország</u>				
Kisbajcs (Kb)	MS 192 SI	nem	nem	nem
	MS 195 SI	nem	nem	nem
	MS 198 SI	nem	nem	nem
	MS 203 SI	nem	nem	nem
	MS 260 SI	nem	nem	nem
	MS 268 SI	nem	nem	nem
	MS 397 SI	igen	nem	nem
<u>Győr (Gy)</u>				
	MS 192 SI	nem	nem	nem
	MS 195 SI	nem	nem	nem
	MS 198 SI	nem	nem	nem
	MS 203 SI	nem	nem	nem
	MS 260 SI	nem	nem	nem
	MS 268 SI	nem	nem	nem
	MS 397 SI	nem	nem	nem
<u>Balaton (Ba)</u>				
	MS 192 SI	nem	nem	nem
	MS 195 SI	nem	nem	nem
	MS 198 SI	nem	nem	nem
	MS 203 SI	nem	nem	nem
	MS 260 SI	nem	nem	nem
	MS 268 SI	nem	nem	nem
	MS 397 SI	nem	nem	nem
<u>Dalmand (Da)</u>				
	MS 192 SI	igen	nem	nem
	MS 195 SI	igen	nem	igen
	MS 198 SI	nem	nem	nem
	MS 203 SI	igen	nem	nem
	MS 260 SI	nem	nem	nem
	MS 268 SI	nem	nem	nem
	MS 397 SI	nem	nem	nem
<u>Attala (At)</u>				
	MS 192 SI	nem	nem	nem
	MS 195 SI	nem	nem	nem
	MS 198 SI	nem	nem	nem
	MS 203 SI	nem	nem	nem
	MS 260 SI	nem	nem	nem
	MS 268 SI	nem	nem	nem

	<i>MS 397 SI</i>	<i>igen</i>	nem	nem
Akasztó (Ak)	<i>MS 192 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 195 SI</i>	<i>igen</i>	nem	nem
	<i>MS 198 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 203 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 260 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 268 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 397 SI</i>	nem	nem	nem
Nyíregyháza (Ny)	<i>MS 192 SI</i>	<i>igen</i>	nem	nem
	<i>MS 195 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 198 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 203 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 260 SI</i>	<i>igen</i>	nem	nem
	<i>MS 268 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 397 SI</i>	nem	nem	nem
<u>Románia</u>				
Temesvár (Ti)	<i>MS 192 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 195 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 198 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 203 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 260 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 268 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 397 SI</i>	nem	nem	nem
Duna-delta torkolat (De)	<i>MS 192 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 195 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 198 SI</i>	<i>igen</i>	nem	nem
	<i>MS 203 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 260 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 268 SI</i>	nem	nem	nem
	<i>MS 397 SI</i>	nem	nem	nem

M8. Sügér (*Perca fluviatilis*) mikroszatellit markerek jellemzése

M8.1 Sügér mikroszatellit markerek általános jellemzése:

Jellemzés az klónozott mikroszatellit allél ismétlődést tartalmazó régiójának szekvenciája, a klónozott mikroszatellit allél mérete, a vizsgált egyedszám, a detektált allélok száma és mérettartománya, valamint a várt és megfigyelt heterozigotizáció értékek, a HWE-teszt, a PIC (Polymorph Information Content), továbbá a génbanki azonosítók tekintetében.

Mikroszatellit marker	A klónozott mikroszatellit allél ismétlődést tartalmazó régiójának szekvenciája	Klónozott mikroszatellit allél mérete (bázispár)	Allél mérettartomány (bázispár)	Vizsgált egyedszám	Detektált allélok száma	H _E	H _O	HWE	PIC	Génbanki azonosító
MS 426 P ^{ff}	(AC) ₁₃	160	148-160	182	6	lsd. alább				KX834191
MS 427 P ^{ff}	(TG) ₇ N(GT) ₂₉ N(TG) ₁₀	213	153-271	182	40	lsd. alább				KX834192
MS 428 P ^{ff}	(TG) ₆₆	193	89-227	182	48	lsd. alább				KX834193
MS 432 P ^f	(GT) ₁₆	102	93-103	8	5	0,792	0,375	***	0,701	KX834194
MS 439 P ^{ff}	(GT) ₉ N ₄ (GA) ₆	187	185-191	182	3	lsd. alább				KX834195
MS 441 P ^f	(CA) ₁₄	111	107-115	8	5	0,767	0,375	*	0,670	KX834196
MS 449 P ^f	(TG) ₄₂	236	197-269	8	12	0,958	0,875	ns	0,890	KX834197
MS 450 P ^f	(CA) ₄₃	226	177-247	8	12	0,967	0,625	***	0,897	KX834198
MS 455 P ^f	(AC) ₃₃	171	170-193	8	6	0,783	1,000	*	0,693	KX834199
MS 464 P ^{ff}	(TC) ₁₀ (AC) ₃₅	196	169-275	182	38	lsd. alább				KX834200
MS 467 P ^{ff}	(GT) ₂₁	130	136-144	182	5	lsd. alább				KX834201
MS 484 P ^f	(AC) ₁₆ N ₃ (CA) ₆ N(AC) ₇ N ₂ (AC) ₅	167	134-173	8	9	0,917	1,000	ns	0,844	KX834202
MS 500 P ^{ff}	(GA) ₅ N(AG) ₁₁ N ₄₈ (CA) ₆ N(TC) ₅ (AC) ₁₁	123	120-133	182	5	lsd. alább				KX834203
MS 716 P ^f	(CA) ₁₄	136	133-139	8	4	0,742	0,500	**	0,636	KX834204

<i>MS 719 P[#]</i>	(CA) ₆ N(AC) ₇	129	125-155	182	13	lsd. alább				KX834205
<i>MS 723 P^f</i>	(GA) ₂₂	116	112-141	8	11	0,933	0,875	ns	0,864	KX834206
<i>MS 725 P[#]</i>	(TG) ₁₀	222	218-327	182	15	lsd. alább				KX834207
<i>MS 726 P[#]</i>	(AC) ₁₄	141	137-214	182	26	lsd. alább				KX834208
<i>MS 728 P^f</i>	(TG) ₁₈	198	199-215	8	7	0,883	0,750	ns	0,810	KX834209
<i>MS 729 P^f</i>	(AG) ₃₇	203	177-253	8	11	0,950	0,750	ns	0,880	KX834210
<i>MS 730 P^f</i>	(CT) ₃₂	205	199-237	8	9	0,892	0,625	ns	0,817	KX834211
<i>MS 732 P[#]</i>	(GT) ₁₀	205	201-230	182	10	lsd. alább				KX834212
<i>MS 737 P^f</i>	(GT) ₃₇ (GA) ₇	361	339-370	8	9	0,925	0,625	*	0,853	KX834213
<i>MS 739 P[#]</i>	(GT) ₁₆ N(TG) ₅	179	173-209	182	13	lsd. alább				KX834214
<i>MS 745 P^f</i>	(CA) ₂₈	219	243-277	8	7	0,750	0,500	ns	0,678	KX834215

H_E: várt heterozigotitás, H_O: megfigyelt heterozigotitás, HWE: a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés szignifikanciája (P>0,05 ns – a különbség nem szignifikáns; * 0,01<P<0,05, ** 0,001<P<0,01, *** P<0,001 - a különbség szignifikáns); PIC: Polymorphic Information Content. # A populációgenetikai analízisben alkalmazott markerek.

M8.2 Populációgenetikai analízis során alkalmazott sügér mikroszatellit markerek jellemzése:

Vizsgált állomány	Mikroszatellit marker	Detektált allélok száma	Allél mérettartomány (bázispár)	Ar	Gén-diverzitás	PIC	H _E	H _O	HWE
Magyarország									
Dunaföldvár (Hu-D; N=43)	<i>MS 426 P^f</i>	5	152-160	4,653	0,404	0,376	0,404	0,381	ns
	<i>MS 427 P^f</i>	14	153-257	12,283	0,787	0,758	0,786	0,714	ns
	<i>MS 428 P^f</i>	24	97-227	20,402	0,941	0,922	0,938	0,700	***
	<i>MS 439 P^f</i>	1	189	1,000	0,000	0,000	0,00	0,000	-
	<i>MS 464 P^f</i>	17	171-237	14,160	0,882	0,854	0,877	0,465	***
	<i>MS 467 P^f</i>	4	136-144	3,960	0,526	0,471	0,526	0,512	ns

	<i>MS 500 Pf</i>	3	120-126	2,877	0,154	0,146	0,154	0,163	ns
	<i>MS 719 Pf</i>	8	125-151	7,633	0,772	0,735	0,770	0,535	**
	<i>MS 725 Pf</i>	5	218-226	4,532	0,661	0,590	0,659	0,535	**
	<i>MS 726 Pf</i>	6	141-160	6,000	0,709	0,661	0,703	0,333	***
	<i>MS 732 Pf</i>	8	201-222	8,000	0,775	0,729	0,771	0,536	***
	<i>MS 739 Pf</i>	9	181-201	8,934	0,851	0,814	0,848	0,636	**
Biatorbágy (Hu-B, N=80)	<i>MS 426 Pf</i>	4	152-158	3,690	0,407	0,361	0,406	0,291	**
	<i>MS 427 Pf</i>	15	180-261	11,129	0,814	0,790	0,814	0,813	***
	<i>MS 428 Pf</i>	32	99-227	21,323	0,934	0,924	0,934	0,863	***
	<i>MS 439 Pf</i>	1	189	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-
	<i>MS 464 Pf</i>	20	171-257	13,535	0,832	0,810	0,831	0,684	***
	<i>MS 467 Pf</i>	4	136-144	3,981	0,547	0,495	0,547	0,538	*
	<i>MS 500 Pf</i>	4	120-133	2,699	0,205	0,186	0,204	0,025	***
	<i>MS 719 Pf</i>	7	125-149	6,740	0,735	0,689	0,736	0,900	***
	<i>MS 725 Pf</i>	3	222-226	3,000	0,657	0,577	0,656	0,500	**
	<i>MS 726 Pf</i>	8	137-160	7,759	0,806	0,775	0,806	0,750	**
	<i>MS 732 Pf</i>	5	205-220	4,276	0,604	0,523	0,602	0,250	***
	<i>MS 739 Pf</i>	11	173-209	7,761	0,755	0,717	0,755	0,788	ns
Lengvelország									
Olsztyn (Po-O, N=59)	<i>MS 426 Pf</i>	4	148-160	2,949	0,437	0,354	0,438	0,508	ns
	<i>MS 427 Pf</i>	30	199-271	23,620	0,958	0,944	0,955	0,627	***
	<i>MS 428 Pf</i>	9	89-107	7,648	0,795	0,756	0,795	0,729	ns
	<i>MS 439 Pf</i>	3	185-191	2,201	0,050	0,049	0,050	0,051	ns
	<i>MS 464 Pf</i>	32	169-275	25,275	0,963	0,952	0,962	0,814	**

	<i>MS 467 Pf</i>	2	140-142	1,981	0,097	0,092	0,097	0,102	ns
	<i>MS 500 Pf</i>	1	124	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-
	<i>MS 719 Pf</i>	10	125-155	8,710	0,742	0,709	0,743	0,797	ns
	<i>MS 725 Pf</i>	11	224-327	9,832	0,858	0,828	0,853	0,321	***
	<i>MS 726 Pf</i>	18	168-214	16,802	0,935	0,918	0,931	0,509	***
	<i>MS 732 Pf</i>	3	205-230	2,217	0,051	0,050	0,051	0,052	ns
	<i>MS 739 Pf</i>	5	181-192	4,191	0,546	0,464	0,545	0,458	ns

N: vizsgált egyedek száma; detektált allélok száma és mérettartománya; allélgazdagság (A_r); géndiverzitás; Polymorphic Information Content (PIC); várt heterozigotitás (H_E); megfigyelt heterozigotitás (H_O); Hardy-Weinberg Egyensúlytól való eltérés szignifikanciája (HWE). $P > 0,5$, nem szignifikáns az eltérés a Hardy-Weinberg Egyensúlytól (ns); * $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$ szignifikáns az eltérés az Hardy-Weinberg Egyensúlytól. A HWE-tesztben egyes markerek monomorfnek bizonyultak az adott populációban (-).

M9. Sügér (*Perca fluviatilis*) populációgenetikai analízisben alkalmazott mikroszatellit markerekeinek jellemzése – null-allél jelenlétének valószínűsége, allél kiesés valószínűsége, valamint genotipizálási hibák valószínűsége alapján

Vizsgált állomány	Mikroszatellit marker	Null-allél valószínűsége	Allél kiesés valószínűsége	Genotipizálási hiba valószínűsége
<u>Magyarország</u>				
Dunaföldvár (Hu-D)	MS 426 Pf	nem	nem	nem
	MS 427 Pf	nem	nem	nem
	MS 428 Pf	igen	nem	nem
	MS 439 Pf	nem	nem	nem
	MS 464 Pf	igen	nem	igen
	MS 467 Pf	nem	nem	nem
	MS 500 Pf	nem	nem	nem
	MS 719 Pf	igen	nem	nem
	MS 725 Pf	nem	nem	nem
	MS 726 Pf	igen	nem	igen
	MS 732 Pf	igen	nem	nem
	MS 739 Pf	igen	nem	nem
<u>Biatorbágy (Hu-B)</u>				
	MS 426 Pf	igen	nem	nem
	MS 427 Pf	nem	nem	nem
	MS 428 Pf	igen	nem	igen
	MS 439 Pf	nem	nem	nem
	MS 464 Pf	igen	nem	igen
	MS 467 Pf	nem	nem	nem
	MS 500 Pf	igen	nem	igen
	MS 719 Pf	nem	nem	nem
	MS 725 Pf	igen	nem	igen
	MS 726 Pf	nem	nem	nem
	MS 732 Pf	igen	nem	igen
	MS 739 Pf	nem	nem	nem
<u>Lengyelország</u>				
Olsztyn (Po-O)	MS 426 Pf	nem	nem	nem
	MS 427 Pf	igen	nem	igen
	MS 428 Pf	nem	nem	nem
	MS 439 Pf	nem	nem	nem
	MS 464 Pf	igen	nem	igen
	MS 467 Pf	nem	nem	nem
	MS 500 Pf	nem	nem	nem
	MS 719 Pf	nem	nem	nem
	MS 725 Pf	igen	nem	igen
	MS 726 Pf	igen	nem	igen
	MS 732 Pf	nem	nem	nem
	MS 739 Pf	nem	nem	nem

M10. Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) mikroszatellit markerek jellemzése

M10.1 Afrikai harcsa mikroszatellit markerek általános jellemzése:

Jellemzés az klónozott mikroszatellit allél ismétlődést tartalmazó régiójának szekvenciája, a klónozott mikroszatellit allél mérete, a vizsgált egyedszám, a detektált allélok száma és mérettartománya, valamint a várt és megfigyelt heterozigotizás értékek, a HWE-teszt, továbbá a génbanki azonosítók tekintetében.

Mikroszatellit marker	A klónozott mikroszatellit allél ismétlődést tartalmazó régiójának szekvenciája	Klónozott mikroszatellit allél mérete (bázispár)	Allél mérettartomány (bázispár)	Vizsgált egyedszám	Detektált allélok száma	H _E	H _O	HWE	Génbanki azonosító
<i>MS 2 Cg</i>	(CT) ₈ (CA) ₂₆	112	86-112	32	6	0,679	0,833	ns	KX834137
<i>MS 3 Cg</i>	(CA) ₁₂ TA(CA) ₁₇	144	132-150	32	10	0,737	1,000	ns	KX834138
<i>MS 10 Cg</i>	(GT) ₁₃ (GA) ₃ N ₅ (AG) ₅	117	98-136	32	10	0,787	0,906	***	KX834139
<i>MS 40 Cg</i>	(GT) ₈ GCGC(AT) ₄	157	149-160	32	3	0,528	0,906	***	KX834140
<i>MS 122 Cg/A</i>	(CT) ₈ N ₁₁ (AC) ₁₅	166	154-166	32	6	0,468	0,552	ns	KX834141
<i>MS 122 Cg/B</i>	(TC) ₇	255	241-257	32	2	0,320	0,400	ns	KX834141
<i>MS 132 Cg</i>	(GT) ₂₁	107	102-135	32	6	0,649	0,645	**	KX834142
<i>MS 175 Cg</i>	(TC) ₈ (AC) ₁₅	158	153-200	32	11	0,793	0,875	***	KX834143
<i>MS 214 Cg</i>	(CA) ₁₅	153	142-161	32	5	0,688	0,844	***	KX834144
<i>MS 236 Cg</i>	(GT) ₈ N ₂ (GT) ₉	250	250-265	32	5	0,478	0,387	ns	KX834145
<i>MS 243 Cg</i>	(TG) ₁₅ (CA) ₈	193	273-298	32	5	0,625	0,323	***	KX834146
<i>MS 285 Cg</i>	(GT) ₂₅ N ¹²⁷ (TG) ₁₇	328	333-336	8	4	0,582	0,714	*	KX834147
<i>MS 287 Cg</i>	(CA) ₅	118	107-119	32	6	0,607	0,969	***	KX834148
<i>MS 288 Cg</i>	(GT) ₂₁	158	162-186	32	5	0,556	0,548	***	KX834149
<i>MS 289 Cg</i>	(GT) ₁₃	100	100-113	32	4	0,643	0,813	ns	KX834150
<i>MS 290 Cg</i>	(AC) ₅ N ₇₂ (AC) ₁₇ N ₁₆ (AC) ₅	230	222-236	32	5	0,523	0,469	***	KX834151

<i>MS 294 Cg</i>	(TG) ₆ N ₆ (TG) ₈ N ₆ (TG) ₅ N ₆ (TG) ₅ N ₁₆ (TG) ₉ N ₁₆ (TG) ₁₅ N ₃ (TG) ₈ N ₂ (TG) ₁₈ N ₁₂ (TG) ₁₂	330	308-338	32	6	0,649	0,469	**	KX834152
<i>MS 298 Cg</i>	(TG) ₉	168	168-202	32	6	0,655	0,621	***	KX834153
<i>MS 299 Cg</i>	(AC) ₂₁	274	250-271	32	5	0,475	0,406	***	KX834154
<i>MS 305 Cg</i>	(CA) ₅	132	122-133	8	2	0,500	1,000	**	KX834155
<i>MS 307 Cg</i>	(GT) ₇	102	96-100	32	2	0,441	0,281	*	KX834156
<i>MS 308 Cg</i>	(CA) ₁₉ N ₆₆ (CA) ₆ N ₆ (CA) ₆ N ₄ (CA) ₈ N ₂ (CA) ₉ N ₄ (CA) ₆	236	235-244	8	2	0,117	0,125	ns	KX834157
<i>MS 312 Cg</i>	(CA) ₁₄	206	207-227	32	7	0,669	0,563	***	KX834158
<i>MS 316 Cg</i>	(GT) ₇ N(TG) ₅ (AG) ₁₈	112	86-112	32	5	0,674	0,774	ns	KX834159
<i>MS 321 Cg</i>	(CA) ₂₀	222	224-266	8	5	0,664	0,500	ns	KX834160
<i>MS 330 Cg</i>	(AC) ₈ N ₂₂ (AC) ₁₂ N ₉ (CA) ₁₃	179	173-177	32	2	0,324	0,281	ns	KX834161
<i>MS 332 Cg</i>	(CA) ₅ N ₁₈ (CA) ₁₄	149	140-157	32	5	0,644	0,594	ns	KX834162
<i>MS 336 Cg</i>	(CA) ₁₀	293	293-300	32	4	0,547	0,258	***	KX834163
<i>MS 337 Cg</i>	(GT) ₅ N ₁₅ (TG) ₅ N ₃₃ (TG) ₅ N ₃₇ (GT) ₇ N ₇₂ (GT) ₆	104	98-107	32	3	0,443	0,484	ns	KX834164
<i>MS 339 Cg</i>	(TGTGTGAGAG) ₈	144	134-196	32	6	0,745	0,935	**	KX834165
<i>MS 341 Cg</i>	(TG) ₁₉	163	150-169	32	7	0,508	0,313	***	KX834166
<i>MS 344 Cg</i>	(TG) ₁₁ N ₉₉ (CT) ₅	215	202-220	32	5	0,410	0,281	***	KX834167
<i>MS 346 Cg</i>	(TG) ₁₁ N ₁₂₇ (CAGA) ₅ N ₁₂₅ (GT) ₅	150	149-160	32	3	0,147	0,156	ns	KX834168
<i>MS 350 Cg</i>	(GT) ₁₇	103	81-111	32	7	0,606	0,406	**	KX834169
<i>MS 352 Cg</i>	(GT) ₁₉	228	204-246	32	6	0,554	0,613	ns	KX834170
<i>MS 354 Cg</i>	(GT) ₁₇	212	199-219	32	5	0,600	0,552	***	KX834171
<i>MS 355 Cg</i>	(AC) ₂₀	170	125-183	32	4	0,176	0,063	***	KX834172
<i>MS 357 Cg</i>	(CA) ₆ N ₃₃ (TG) ₂₆	328	328-343	32	4	0,477	0,500	ns	KX834173

<i>MS 367 Cg</i>	(CA) ₁₇ N ₂ (CA) ₂₉	197	199-247	32	4	0,174	0,063	***	KX834174
<i>MS 370 Cg</i>	(AC) ₁₃ N ₁₅ (AC) ₁₉	287	275-287	32	5	0,506	0,484	ns	KX834175
<i>MS 638 Cg</i>	(AC) ₁₆	238	239-250	32	4	0,206	0,226	ns	KX834176
<i>MS 639 Cg</i>	(AC) ₁₀	177	177-220	32	5	0,710	0,344	***	KX834177
<i>MS 643 Cg</i>	(AC) ₁₈	309	304-316	8	2	0,375	0,500	ns	KX834178
<i>MS 644 Cg</i>	(GT) ₁₆	125	127-134	32	3	0,557	0,563	ns	KX834179
<i>MS 645 Cg</i>	(AC) ₄₁	191	186-191	32	2	0,479	0,094	***	KX834180
<i>MS 647 Cg</i>	(GT) ₁₀	122	116-130	32	6	0,732	0,793	ns	KX834181
<i>MS 649 Cg</i>	(CA) ₁₆	167	157-170	32	5	0,329	0,281	ns	KX834182
<i>MS 651 Cg</i>	(GT) ₁₅	168	145-211	32	5	0,598	0,313	***	KX834183
<i>MS 652 Cg</i>	(TG) ₂₁	113	112-161	32	5	0,574	0,531	**	KX834184
<i>MS 653 Cg</i>	(AC) ₈ N ₈₈ (AC) ₆	181	180-192	32	4	0,654	0,710	*	KX834185
<i>MS 657 Cg</i>	(TG) ₆ N(GT) ₁₀ N(TG) ₇	154	150-164	32	5	0,559	0,531	***	KX834186
<i>MS 661 Cg</i>	(AC) ₁₃	122	106-145	32	7	0,765	0,906	*	KX834187
<i>MS 663 Cg</i>	(GT) ₂₁ (GA) ₁₈	197	195-201	32	2	0,299	0,031	***	KX834188
<i>MS 665 Cg</i>	(AC) ₁₀	122	119-181	32	5	0,694	0,548	*	KX834189
<i>MS 668 Cg</i>	(AG) ₈ (TG) ₁₀	266	269-274	8	2	0,117	0,125	ns	KX834190

H_E: várt heterozigotitás, H_O: megfigyelt heterozigotitás, HWE: a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés szignifikanciája (P>0,05 ns – a különbség nem szignifikáns; * 0,01<P<0,05, ** 0,001<P<0,01, *** P<0,001 - a különbség szignifikáns).

M10.2 Afrikai harcsa mikroszatellit markerek polimorfitásának jellemzése:

Lókuszt megnevezése	Polymorphic Information Content (PIC)	Allélgazdagság (Ar)	Géndiverzitás
<i>MS 2 Cg</i>	0,624	5,718	0,688
<i>MS 3 Cg</i>	0,711	9,216	0,745
<i>MS 10 Cg</i>	0,761	9,245	0,798
<i>MS 40 Cg</i>	0,418	2,967	0,530
<i>MS 122 Cg/A</i>	0,435	5,690	0,475
<i>MS 122 Cg/B</i>	0,269	2,000	0,324
<i>MS 132 Cg</i>	0,618	5,973	0,660
<i>MS 175 Cg</i>	0,763	10,024	0,804
<i>MS 214 Cg</i>	0,639	4,998	0,697
<i>MS 236 Cg</i>	0,437	4,677	0,487
<i>MS 243 Cg</i>	0,587	4,976	0,640
<i>MS 285 Cg</i>	0,520	4,000	0,619
<i>MS 287 Cg</i>	0,532	5,591	0,611
<i>MS 288 Cg</i>	0,503	4,677	0,566
<i>MS 289 Cg</i>	0,571	3,995	0,634
<i>MS 290 Cg</i>	0,468	4,929	0,532
<i>MS 294 Cg</i>	0,585	5,928	0,662
<i>MS 298 Cg</i>	0,605	5,887	0,667
<i>MS 299 Cg</i>	0,443	4,807	0,483
<i>MS 305 Cg</i>	0,375	2,000	0,500
<i>MS 307 Cg</i>	0,344	2,000	0,451
<i>MS 308 Cg</i>	0,110	1,875	0,125
<i>MS 312 Cg</i>	0,640	6,802	0,681
<i>MS 316 Cg</i>	0,613	4,815	0,683
<i>MS 321 Cg</i>	0,618	4,742	0,723
<i>MS 330 Cg</i>	0,271	2,000	0,330
<i>MS 332 Cg</i>	0,587	4,807	0,655
<i>MS 336 Cg</i>	0,488	3,976	0,561
<i>MS 337 Cg</i>	0,369	2,976	0,449
<i>MS 339 Cg</i>	0,709	5,996	0,754
<i>MS 341 Cg</i>	0,490	6,777	0,520
<i>MS 344 Cg</i>	0,378	4,774	0,418
<i>MS 346 Cg</i>	0,142	2,962	0,149
<i>MS 350 Cg</i>	0,557	6,736	0,619
<i>MS 352 Cg</i>	0,528	5,838	0,562
<i>MS 354 Cg</i>	0,559	4,897	0,611
<i>MS 355 Cg</i>	0,171	3,902	0,180
<i>MS 357 Cg</i>	0,434	4,000	0,486
<i>MS 367 Cg</i>	0,167	3,624	0,179
<i>MS 370 Cg</i>	0,474	4,993	0,515
<i>MS 638 Cg</i>	0,195	3,677	0,209
<i>MS 639 Cg</i>	0,665	4,999	0,728
<i>MS 643 Cg</i>	0,305	2,000	0,393

<i>MS 644 Cg</i>	0,457	2,999	0,566
<i>MS 645 Cg</i>	0,401	2,995	0,493
<i>MS 647 Cg</i>	0,688	5,887	0,744
<i>MS 649 Cg</i>	0,315	4,802	0,335
<i>MS 651 Cg</i>	0,561	4,967	0,612
<i>MS 652 Cg</i>	0,546	5,807	0,584
<i>MS 653 Cg</i>	0,595	3,997	0,664
<i>MS 657 Cg</i>	0,506	4,961	0,569
<i>MS 661 Cg</i>	0,728	6,806	0,775
<i>MS 663 Cg</i>	0,279	3,000	0,308
<i>MS 665 Cg</i>	0,641	4,994	0,708
<i>MS 668 Cg</i>	0,110	1,875	0,125

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik támogatták és segítettek munkám elvégzését és dolgozatom elkészítését:

- témavezetőmnek Dr. Kovács Balázsnak, a Halgazdálkodási Tanszék munkatársának, az irányítást, tanítást, tanácsolást és a sok javítást.
- Dr. Csenki-Bakos Katalinnak, a laboratóriumi gyakorlatban nyújtott segítségét és türelmét.
- Ősz Ágnesnek, a nagyszámú gélelektroforézis során nyújtott segítségéért.
- Buza Eszternek és Kovács Gyulának a süllyő mikroszatellit analízisben nyújtott segítségéért
- Mindazon kollégának, akik a mintagyűjtésben segítettek,
- valamennyi, Regionális Egyetemi Tudásközpontban, továbbá a Halgazdálkodási Tanszéken és a Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszéken dolgozó kollégának.

Az itt eltöltött évek alatt nem csupán együtt, vagy éppen egymás mellett dolgoztunk, hanem sok közös jó élményben lehetett részünk, miközben jó barátokká is váltunk.

Szeretném megköszönni családomnak a kitartásra ösztönző bátorítását, különösen férjemnek, Péternek és szüleinknek, akik olyan sokat vigyáztak gyermekeinkre, amíg „Anyá tanult”.

A doktori értekezéshez kapcsolódó kutatómunka, valamint számos egyéb részfeladat a GINOP-2.3.2-15-2016-00025 számú Pályázat - Magyarország Kormánya és az Európai Regionális Fejlesztési Alap - támogatásával valósult meg.