



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**

**Molekuláris módszerek fejlesztése és  
alkalmazása közösségi és horgászati jelentőségű  
halfajok vizsgálatához**

Doktori (PhD) értekezés

DOI: 10.54598/001910

Keszte Szilvia

Gödöllő

2022.

*„Varietas delectat” – „A változatosság gyönyörködtet”  
Marcus Tullius Cicero*

**A doktori iskola megnevezése:** Állatbiotechnológia és Állattudományi Doktori Iskola

**Tudományága:** Állattenyésztés-tudományok

**Vezetője:** Dr. Mézes Miklós

Intézet igazgató, az MTA rendes tagja

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem,

Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

**Témavezető:** Dr. Kovács Balázs

Tudományos főmunkatárs

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem

Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Molekuláris Ökológia Tanszék

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

# Tartalom

Jelölések és rövidítések jegyzéke.....	6
1. BEVEZETÉS.....	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	10
2.1 A biodiverzitás jelentősége .....	10
2.2 A védett, közösségi jelentőségű és invazív halfajok helyzete Magyarországon .....	12
2.3 A vizsgált halfajok ismertetése .....	13
2.3.1 A kősüllő ( <i>Sander volgensis</i> , Gmelin, 1788).....	13
2.3.2 A garda ( <i>Pelecus cultratus</i> , Linnaeus, 1758) .....	15
2.3.3 Az ezüstkárász ( <i>Carassius gibelio</i> , Bloch, 1782).....	17
2.4. A molekuláris genetikai markerek jelentősége és jellemzése .....	18
2.4.1. Alloenzimek.....	19
2.4.2 RFLP markerek .....	19
2.4.3 RAPD markerek .....	19
2.4.4. AFLP .....	20
2.4.5. Mikroszatellitek.....	20
2.4.6 SNP markerek.....	23
2.4.7 Mitokondriális DNS markerek.....	24
2.5. Molekuláris genetikai markerek alkalmazása az akvakultúrában és természetes vízi állományok vizsgálatában .....	25
2.6. Populációgenetikai számítások a genetikai diverzitás felméréséhez .....	28
2.6.1. Populációgenetikai számítások a mikroszatellit markereknél .....	28
2.6.2. Populációgenetikai számítások a mitokondriális markereknél.....	30
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	32
3.1 Mintagyűjtés .....	32
3.2 DNS izolálás.....	33
3.3 Mikroszatellit vizsgálatok.....	33
3.3.1. Mikroszatellit markerek adaptálása.....	36
3.3.2. Kapilláris gélelektroforézis.....	36
3.4. Mitokondriális DNS vizsgálatok.....	37
3.4.1. A mitokondriális PCR-ek.....	37
3.4.2. A mitokondriális szekvenálás .....	37
3.5 Az adatok elemzése populációgenetikai szoftverekkel .....	38
3.5.1. Mikroszatellit markerek szoftveres elemzése .....	38
3.5.2. Mitokondriális markerek szoftveres elemzése .....	39
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....	40
4.1. A kősüllő.....	40

4.1.1. A kősüllőn végzett mikroszatellit marker vizsgálatok.....	40
4.1.2 A kősüllőn végzett mitokondriális marker vizsgálatok .....	46
4.2. Az ezüstkárász.....	51
4.2.1 Az ezüstkárász D-loop régiójának vizsgálata.....	51
4.2.2 Az ezüstkárász Citokróm <i>b</i> régiójának vizsgálata.....	58
4.2.3 Az ezüstkárász Citokróm oxidáz 1 vizsgálata .....	60
4.3. A garda.....	62
4.3.1. Mikroszatellit markerek adaptációja garda fajra .....	62
4.3.2 A garda mitokondriális vizsgálata .....	62
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	68
5.1. Marker adaptálhatóság rokon fajok között .....	68
5.2. Kősüllő populációgenetikai vizsgálatok .....	69
5.3. Ezüstkárász populációgenetikai vizsgálatok .....	69
5.4 Garda populációgenetika vizsgálatok .....	71
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	72
7. ÖSSZEFOGLALÁS .....	73
8. SUMMARY.....	75
9. MELLÉKLET .....	77
Melléklet 1. Irodalomjegyzék.....	77
Melléklet 2. A kősüllő vizsgálatához tesztelt mikroszatellit markerek jellemzése .....	95
Melléklet 3. A kősüllő ( <i>Sander volgensis</i> ) populációk mikroszatellit vizsgálata során detektált allél méretek .....	96
Melléklet 5. Kősüllő mikroszatellit vizsgálatok során detektált privát allélok helye, az őket hordozó egyedek és az allél méretekkel.....	100
Melléklet 7. Kősüllő populációk diverzitásának főtenhely koordináta ábrázolásai , ahol az egyedek megoszlásából mért differenciációt a populáció (kék-Balaton, narancs-Tisza_Holt-Körös, szürke-Duna) páronkénti mátrix egyes tengelyeire (Axis 1, Axis 2, Axis 3), illetve a fő koordinátára (Coord. 1, Coord. 2) levetítve mutatja be. ....	102
Melléklet 8. Az ezüstkárász filogenetikai törzsfáihoz beillesztett referencia szekvenciák .....	103
Melléklet 9. Ezüstkárász ( <i>Carassius gibelio</i> ) citokróm <i>b</i> (9/a) és citokróm oxidáz I (9/b) haplotípusok és az őket meghatározó polimorf bázisok .....	105
Melléklet 10. Garda filogenetikai vizsgálata során használt referencia szekvenciák és eredetük.....	106
Melléklet 11. Garda filogenetikai vizsgálata során használt mikroszatellit markerek ismertetői.....	108
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	109

## Jelölések és rövidítések jegyzéke

<b>AFLP:</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism (Amplifikált fragmentum hossz-polimorfizmus)
<b>BALD:</b>	Barcode of Life (DNS-vonalkód)
<b>Bi:</b>	Bayesian inference (Bayes-féle következtetés)
<b>BLAST:</b>	The Basic Local Alignment Search Tool
<b>Cyt.B.:</b>	Citokróm <i>b</i>
<b>Co.I.:</b>	Citokróm oxidáz I
<b>DNS:</b>	Dezoxiribonukleinsav
<b>dNTP:</b>	Dezoxiribonukleotid trifoszfát
<b>FAnGR:</b>	Farm Animal Genetic Resources (Haszonállatok Genetikai Erőforrásai)
<b>FAO:</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Az ENSZ Élelmezési és Mezőgazdasági Szervezete)
<b>F<sub>IS</sub>:</b>	A populáción belüli genetikai variancia mérőszáma
<b>F<sub>IT</sub>:</b>	A totális genetikai variancia mérőszáma
<b>F<sub>ST</sub>:</b>	A populációk közötti genetikai variancia mérőszáma
<b>H<sub>E</sub>:</b>	Expected heterozygosity (Várt heterozigotizás)
<b>H<sub>FC</sub>:</b>	Heterozygosity-fitness correlations (Heterozigotizás és fitness korreláció)
<b>H<sub>O</sub>:</b>	Observed heterozygosity (Megfigyelt heterozigotizás)
<b>HWE:</b>	Hardy-Weinberg Equilibrium (Hardy-Weinberg egyensúlyi állapot)
<b>IUCN:</b>	The International Union for Conservation of Nature (Természetvédelmi Világszövetség)
<b>MQ-víz:</b>	Molekuláris tisztaságú víz
<b>MP:</b>	Maximum Parsimony (Maximális parszimónia)
<b>NCBI:</b>	National Centre for Biotechnology Information (Nemzeti Biotechnológia Információs Központ)
<b>PCoA:</b>	Principal Coordinate Analysis (Főkoordináta elemzés)
<b>PCR:</b>	Polymerase Chain Reaction (Polimeráz Lánreakció)
<b>PIC:</b>	Polymorphic Information Content (Polimorf Információs Tartalom)
<b>RAPD:</b>	Random Amplification of Polymorphic DNA (polimorf DNS véletlenszerű amplifikációja)
<b>RFLP:</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism (restrikciós fragment hossz-polimorfizmus)

<b>SNP:</b>	Single Nucleotide Polymorphism (egyetlen nukleotid polimorfizmus)
<b>SSLP:</b>	Simple Sequence Length Polymorphisms (Egyszerű szekvencia hossz polimorfizmus)
<b>STR:</b>	Short Tandem Repeats (Egyszerű szekvencia ismétlődések)
<b>TBE:</b>	TRIS-Bórsav-EDTA puffer
<b>VNTR:</b>	Variable numbers of tandem repeats (Változó számú tandem ismétlődések)

## 1. BEVEZETÉS

A világ népessége az 1990-es évek óta 5,3 milliárdról 7,9 milliárdra nőtt. A növekvő népességgel nőtt az emberek terület- és élelmiszer igénye is. Az ipar és a mezőgazdaság, hogy lépést tudjon tartani a növekvő igényekkel, egyre nagyobb területeket sajátított ki és vont be a termelésbe, emiatt napjainkra a nem megújuló erőforrások kimerülni látszanak. Ennek a kedvezőtlen folyamatnak az eredményei jelenleg már szinte mindenki számára ismertek. A globális CO<sub>2</sub> és más üvegházhatású gázok kibocsátásának növekedése, a többek között ebből is fakadó klímaváltozás, a fajok kipusztulása, és a biodiverzitás csökkenése már senki előtt nem ismeretlen fogalmak. A környezetvédelmi mozgalmak mellett a nagy világszervezetek is igyekeztek nyomom követni a változást (lásd: Biodiverzitási fórum, Rio de Janeiro, 1993; Konferencia a globális felmelegedésről, Hága, 2000; ENSZ Világcsúcs konferencia a fenntartható fejlődésről, Johannesburg, 2002, stb.) és különböző környezetvédelmi stratégiákat, akcióterveket dolgoztak ki a biodiverzitás megőrzése érdekében. Hogy mennyire fontos témává vált a természet- és környezetvédelem, valamint az elmúlt évtizedekben zajló folyamatok káros hatásainak megállítása és visszafordítása, jól mutatja az Európai Unió 2014-től 2020-ig futó kutatás-fejlesztési és innovációs politikáját meghatározó Horizont 2020, majd Horizon Europe programok is. A H2020 program három alappillérijéből az egyik a társadalmi kihívásokat foglalja magába, olyan témákon keresztül, mint az élelmiszerbiztonság, környezetkímélő közlekedés, erőforrás hatékonyság, éghajlatváltozás és a fenntartható mezőgazdaság.

A fenntartható halászat a globális GDP-hez évente 0,1%-kal járul hozzá. Az elmaradottabb országokban, ahol a halászati tevékenység létfontosságú, ez az érték magasabb is lehet. 2020. február 14-én aláírásra került egy globális egyezmény az illegális halászat ellen, mellyel csökkenteni szeretnék a drasztikus túlhalászatot, ami hozzájárul vizeink ökológiai állapotának romlásához. Jelenleg a halászat mértéke a halászati területek több mint egyharmadán meghaladja a fenntartható szintet. Ahhoz azonban, hogy megfelelően tudjunk gazdálkodni erőforrásainkkal úgy, hogy közben segítsük a biodiverzitás megőrzését, elengedhetetlen annak minden aspektusát ismerni, beleértve a genetikai diverzitást is. Hazánk természetesvízi halpopulációiról, pláne a gazdasági jelentőséggel tradicionálisan nem, vagy kis mértékben rendelkező fajok genetikai hátteréről még igen keveset tudunk, holott az elmúlt évtizedekben itthon is számos olyan eseménynek lehettünk tanúi, melyek drasztikus hatással bírtak a halfaunára, gondoljunk csak a tiszai cianid szennyezésre, vagy a Marcalt érintő vörösiszap katasztrófára. A molekuláris módszerek fejlődésével és a genetikai markerek megjelenésével kezünkbe kerültek a megfelelő eszközök a hazai halpopulációk genetikai diverzitásának felmérésére, filogenetikai vizsgálatára, ezzel feltérképezve az állományok aktuális állapotát, és a múltbéli események hatásait az egyes populációkra. Ezek a vizsgálatok kiemelten fontosak az idők során lecsökkent méretű populációkkal rendelkező őshonos, és közösségi jelentőségű fajok, mint a megfogyatkozott balatoni garda (*Pelecus cutratus*) populáció, valamint az egyre több teret nyerő és értékes, őshonos, bennszülött fajainkat kiszorító invazív fajok, mint az ezüstkárász (*Carassius gibelio*) esetében is. Az utóbbi évtizedek bebizonyították, hogy mind a valami ellen (például az algavirágzás megfékezésére betelepített, majd kontrollálhatatlanná vált busa-fajok), mind valami érdekében (pl. gazdasági hasznot remélve a törpeharcsák telepítése vizeinkbe) beleavatkozni a természetes rendszerbe



csak felelős döntések és kellő háttérismeret mellett lehetséges. Ehhez járulnak hozzá a biodiverzitás fenntartását és genetikai erőforrásaink megőrzését célzó molekuláris genetikai kutatások.

Kutatásom célkitűzései:

- Mikroszatellit markerek adaptálása populációgenetikai vizsgálatokhoz közeli rokon fajokból az őshonos kősüllő (*Sander volgensis*), valamint a közösségi jelentőségű garda (*Pelecus cultratus*) esetén.
- Mitokondriális genomi markerek (Citokróm *b*, Kontroll régió, Citokróm oxidáz I) alkalmazhatóságának felmérése filogenetikai és taxonómiai vizsgálatokhoz az invazív ezüstkárász (*Carassius gibelio*) esetében.
- A Balaton és vízgyűjtő területein található idegenhonos, invazív ezüstkárász populációk genetikai diverzitásának vizsgálata.
- Magyarország nagyobb vizeiben található őshonos kősüllő populáció genetikai diverzitásvizsgálata.
- Magyarországon őshonos garda populációk genetikai diverzitásvizsgálata.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 A biodiverzitás jelentősége

A fajok sokféleségével már Darwin foglalkozni kezdett, azonban a biodiverzitás, mint fogalom, először az 1900-as évek elején került az emberek látóterébe (Harris, 1918). A természeti sokféleség, mint fogalom 1974-ben jelent meg, és John Terborgh nevéhez köthető (Terborgh, 1974). Az első kutató pedig, aki konkrétan a biológiai diverzitás fogalmát definiálta Thomas E. Lovejoy volt 1980-ban (Lovejoy, 1980), akit azóta a biodiverzitás keresztapjaként tartanak számon. Lovejoy a biológiai diverzitás alatt Darwinhoz hasonlóan ekkor még csak a fajok számát említette, a variabilitás, mint bővebb tényező még nem került bele a fogalomba (Swingland, 2000). Az első átfogóbb, hivatalos publikáció, Edward O. Wilson Biodiverzitás című műve, ahol már ez is szerepelt, 1988-ban jelent meg, az 1986-os „Nemzetközi Fórum a Biodiverzitásról” esemény után (Wilson, 1988). A napjainkban egyezményesen használt, hivatalos fogalom 1992-ben született meg Rio de Janeiro-ban az ENSZ által szervezett Környezet és Fejlődés Konferencián. Ekkor született meg a biodiverzitás védelmét szolgáló „Biológiai Sokféleség Egyezmény”. Az egyezmény földünk diverzitásának védelme érdekében az ENSZ országai számára alapelveket, és feladatokat definiál, valamint intézkedik azok végrehajtásának funkcionális, szervezeti, finanszírozási kérdéseiben. Célja a biológiai sokféleség megőrzése, komponenseinek fenntartható használata, a genetikai erőforrások és pénzeszközök hozzáférhetőségének biztosítása. Az egyezményben foglaltak alapján:

„Biológiai sokféleség a bármilyen eredetű élőlények közötti változatosságot jelenti, beleértve többek között a szárazföldi, tengeri és más vízi ökológiai rendszereket, valamint az e rendszereket magukban foglaló ökológiai komplexumokat” (1995. évi LXXXI. Törvény).

A Biológiai Sokféleség Egyezmény élőhelyek védelmére vonatkozó irányelvén nyugszik a Natura2000 hálózat, ami az Európai Unió ökológiai hálózata. Ennek célja, hogy a különböző élőhelytípusok, növény és állatfajok védelmén keresztül biztosítja a biológiai sokféleség megővését. Magyarország a Natura2000 Pannon Biogeográfiai Régiójába tartozik, olyan endemikus fajokat őrizve, mint a rákosi vipera (*Vipera ursinii rakosiensis*), vagy a homoki kikerics (*Colchicum arenarium*). A Natura2000-es területek kijelölésével nemcsak az endemikus, de az olyan fajok megőrzése is feladatunkká vált, melyek hazánk területén ugyan még megtalálhatóak, de európai országokban már veszélyeztetett fajnak minősülnek (Sundseth, 2008). A védett, természetes élőhelyek mellett a génmegőrzésben és fajta-fenntartásban egyre elterjedtebb szerepet játszanak a korábban elsődlegesen szórakoztatási, oktatási céllal létrejött állatkertek, vadasparkok is (Rabb, 1994).

Az IUCN listája alapján jelenleg több mint 37 000 fajt veszélyeztet a kihalás és csak a sugarasúszójú halak osztályából a világon több mint 2400 faj található a fenyegetett kategóriában (súlyosan veszélyeztetett, veszélyeztetett, sebezhető) (IUCN, 2021). Ezen fajok megőrzése nemzeti érdek is. Hazánkban a 2019. évi hatályos jogszabályok értelmében 31 halfaj áll oltalom alatt (Agrárminisztérium, 2020). A diverzitást azonban nem csak a fajok szintjén érdemes nyomon követni.

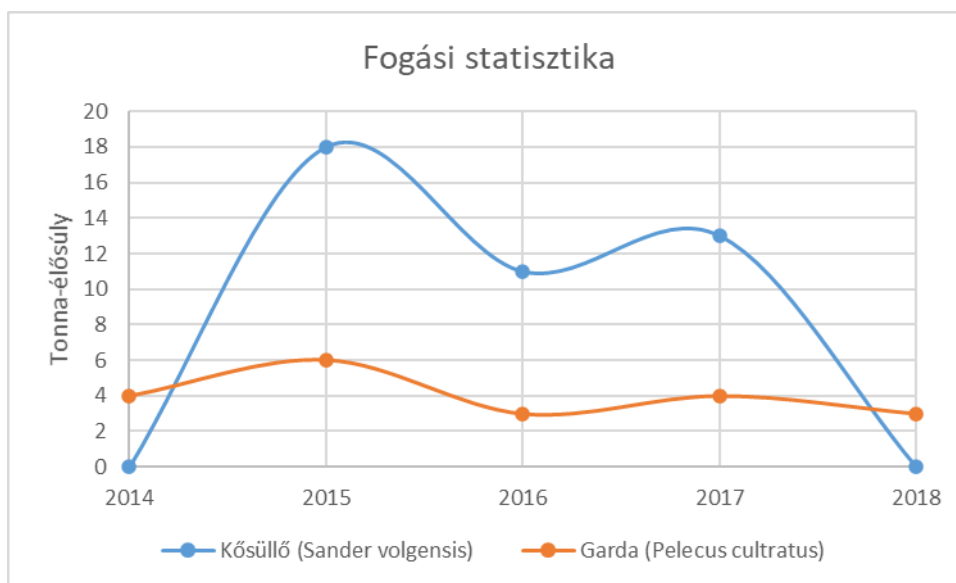
Már Darwin óta tudjuk, hogy a fajok rendkívül nagy változékonyságot mutatnak. A fajokon, populációkon, sőt az egyes egyedek genetikai állományában, a különböző lókuszon kimutatható molekuláris szintű diverzitásvizsgálat azonban csak a technika fejlődésével vált elérhetővé. Napjainkra pedig egyre szélesebb körben vizsgált terület. A globális klímaváltozás és az egyre gyorsabban változó környezeti feltételek az élőlények genetikai diverzitására is kihatnak. A fajoknak három lehetőségük van, hogy lépést tudjanak tartani a bolygón bekövetkező változásokkal:

- adaptáció
- geográfiai szétszóródás (migráció)
- fenotípusos/genotípusos átalakulás (evolúció).

Ha egy adott élőlénynek nincs lehetősége utóbbi kettőre, csak az adaptáció lehetősége marad fenn, amihez azonban elengedhetetlen a kellő szintű genetikai diverzitás. Ha egy populáció erre sem képes, akkor az nemcsak drasztikus létszámcsökkenéshez, de akár kihaláshoz is vezethet (Pauls et al., 2012). Ha egy adott fajon belül a homozigotizáció a genom egész szintjére nézve megnő, például egy erősen beltenyésztett populációban, sokkal nehezebben tudnak reagálni a környezeti hatásokra. Az adott populáció esetén alacsonyabb lesz az evolúciós potenciál, hiszen kisebb eséllyel hordoznak adaptív allélokot (Kirk & Freeland, 2011). Az ökológiai folyamatokra tehát nemcsak a fajok közötti, de az intraspecifikus diverzitás is nagyban kihat (Bolnick et al., 2011). Ez a fajokon belüli változatosság, mely a populációkat jellemző fenotípusos és az ennek háttérében álló genotípus gyakoriságokon alapul, az állatok jellemző biodiverzitás negyedét teszi ki (Raffard et al., 2019). A FAO (Food and Agriculture Organization) már az 1960-as évektől támogatja az országokat az élővilág genetikai háttérének megismerésében. Az első komolyabb lépések a tenyésztett állatok genetikai háttérének megőrzése érdekében az 1990-es évek elején kezdődtek. 1992-ben a FAO egyik világtalálkozóján megszületett a haszonállatok genetikai erőforrásainak felmérését célzó globális stratégia, az AnGR (Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources). Sajnos az elmúlt évtizedekben, bár egyre többet tudunk az élővilág genetikai háttérééről, a genetikai erőforrásainkkal történő gazdálkodásunk egyre aggasztóbb. 2015-ben az ENSZ 15 éves tervet dolgozott ki a fenntartható fejlődés érdekében (United Nations, 2015) olyan célokkal, mint az óceánok és tengerek fenntartható kezelése, a biodiverzitás csökkenésének megállítása és a fenntartható erdőgazdálkodás. A FAO 2020-as jelentése alapján azonban pont a genetikai erőforrások védelmével kapcsolatban nem sikerül a kitűzött célokat teljesíteni. A jelentés alapján 70 országból a helyi haszonállat fajták mintegy 60 %-a veszélyeztetett (FAO, 2019). A genetikai diverzitás csökkenése mellett az őshonos fajok fennmaradására komoly veszélyt jelent az invazív fajok megjelenése is. A mezőgazdaság, az urbanizáció, a kereskedelem, a kereskedelmi útvonalak, a turizmus, az utazás fejlődésével folyamatosan törjük át a korábban meglévő természetes akadályokat az invazív fajok előtt. A molekuláris genetikai módszerek a filogenetikai vizsgálatok és az adaptációs képesség felmérése mellett olyan kérdésekre is választ adhatnak, mint az invazív fajok pontos taxonómiája, eredete, azaz honnan és milyen úton kerültek az adott élőhelyre, és milyen populációszerkezeti változásokon mentek keresztül az idők során.

## 2.2 A védett, közösségi jelentőségű és invazív halfajok helyzete Magyarországon

Az Európai Unió 1992-ben hozta létre a Natura2000 ökológiai hálózatot. A teljes hazai hálózat kiterjedése 1,99 millió ha volt 2015-ben, ami hazánk területének majdnem 22%-a (27/2015. (VI. 17.) OGY határozat). Magyarország az Európai Unióhoz való csatlakozás után kezdte meg jogrendjének harmonizálását az előírt irányelvekkel és 2004-ben megszületett a hazai közösségi jelentőségű élőhelytípusok, állatok és növények védelmét célzó Natura területek kijelöléséről szóló kormányrendelet. A 275/2004. (X.8) Kormányrendelet alapján közösségi jelentőségűek „azon fajok, amelyek közösségi szempontból veszélyeztetettek, sérülékenyek, ritkák, illetőleg bennszülöttek”. A rendelet továbbá kiemelt közösségi jelentőségű fajokat is meghatároz, melyek megőrzéséért a közösség kiemelt felelősséggel tartozik. A közösségi jelentőségű fajok listáján több átfedés is található a hazai védett halfajokkal, mint például a felpillantó küllő (*Gobio uranoscopus*), a leánykoncér (*Rutilus virgo*) vagy a réti csík (*Misgurnus fossilis*). A garda (*Pelecus cultratus*) esetében, akárcsak a vizánál (*Huso huso*), az ívóhelyre vándorlásuknak is akadályt jelentett a Vaskapu-szorosnál megépített gátrendszer. Bár a kősüllő populációk esetében ezek a geográfiai változások nem okoztak nagyobb csapást, az ő állományuk is többször megritkult az elmúlt évtizedekben. A fogási statisztikák szerint hazánkban 2016-ban az éves kősüllő fogás mindössze 11 tonnára tehető, ami 7 tonnával kevesebb, mint az azt megelőző évi adat (FAO adatok, 2018) (1. ábra).



1. ábra: A kősüllő és a garda fogási statisztikája 2014 és 2018 között (FAO, 2019)

Mind a védett, mind a közösségi jelentőségű, és a horgászati szempontból fontos - nem tenyésztett, valamint invazív fajok esetében is a 2014-es év okozott egy nagy áttörést, amikor hatályba lépett a 2013. évi CII. törvény a halgazdálkodásról és a hal védelméről. A törvény elsősorban azt tűzte ki célul, hogy nagyobb hangsúlyt kapjon hazánkban az őshonos halak/halállományok megővése és megújulási lehetőségeik fenntartása. A 14-es § felhívja a figyelmet, hogy nem őshonos fajokat, mint például az invazív ezüstkárászt, csak teljesen zárt, természetes vízzel összeköttetésben nem lévő, lefolyásmentes területre lehet telepíteni, vagy olyan esetben, ha az állomány bizonyítottan szaporodásképtelen és ezáltal ökológiai kockázatot nem jelent.

Invazívnak tekinthetők azok a populációk, melyek több generáción keresztül önfenntartó módon szaporodnak, és az idők során jelentős területen elterjednek a betelepülési ponttól számítva (Richardson et al., 2000). Az idegenhonos fajok számos módon kerülhetnek be egy élőhelyre, halak esetében a leggyakoribb okok:

- Szökés az akvakultúrából
- Sporthorgászati célból telepítés
- Akváriumi díszhalak elengedése
- Csalihalak elszabadulása
- Gazdasági célú betelepítés
- Figyelmetlen ikrakezelés
- Csatornák megnyitása korábban elszigetelt területek között
- Illegális betelepítés (Lenhardt et al., 2011).

A fent leírtak figyelembevételével doktori munkám kitűzött célja a hiányos genetikai információval rendelkező közösségi jelentőségű vagy invazív halfajok közül a kősüllő, a garda és az ezüstkárász fajok állományainak vizsgálata, molekuláris genetikai módszerekkel.

## 2.3 A vizsgált halfajok ismertetése

### 2.3.1 A kősüllő (*Sander volgensis*, Gmelin, 1788)



2. ábra: A kősüllő (Fotó: Dr. Ferincz Árpád)

A kősüllő (2. ábra) a sügérfélék családjába tartozó, hazánkban őshonos, ragadozó halfaj, mely kizárólag Európában, ezen belül a Fekete- és Kaszpi-tenger vízgyűjtő folyóinak vízrendszerében honos. Elterjedésének főbb központjai a Volga és a Duna voltak. Rendszertani besorolása:

*Animalia* (Állatok királysága)

*Chordata* (Gerinchúrosok törzse)

*Vertebrata* (Gerincesek altörzse)

*Gnathostomata* (Állkapcsos gerincesek altörzse)

*Pisces* (Halak főosztálya)

*Actinopterygii* (Sugaras úszójú halak osztálya)

*Perciformes* (Sügéralakúak rendje)

*Percidae* (Sügérfélék családja)

*Luciopercinae* (Süllőfélék alcsaládja)

*Sander* (Süllők neme)

*Sander volgensis* (Kősüllő-faj, Gmelin 1788)

Bár jelenleg nem szerepel, mint veszélyeztetett faj az IUCN vörös listáján, de a FAO (FAO, 2019) fogási statisztikai adatai alapján a 2015-ös évet követően, egyedszámában drasztikus visszaesés volt megfigyelhető, ami tekintve, hogy már a 2000-es évek elején is a hazai halbiomassza alig 1%-át tette ki (Specziár & Bíró, 2003), aggodalomra ad okot. 2012-ben az év halának választották. A faj elterjedéséről a Duna vízgyűjtőjén Banaduc és munkatársai (2016) által végzett vizsgálatokban is találunk adatokat. Ők több faj esetében vizsgálták a különböző populációk méretére ható külső tényezők szerepét. Megállapították, hogy a kősüllőt is magába foglaló sügérfélék családja esetén az elsődleges veszélyeztető tényező az élőhely területi csökkenése, a vízszennyezés és a túlhalászás. Bár a kősüllő rendkívül kedvelt faj a horgászok körében, és kiváló húsminőséggel rendelkezik, halászati szempontból jelentősége elenyésző, ami a fajt érintő alacsony számú kutatásból is látható (Kuznetsov, 2010). Bár egészen a közelmúltig a nem tenyésztett fajok közé tartozott, amelynek állományait a természetes szaporodás tartotta fenn, ma már vannak próbálkozások a termelésbe vonására, de jelentősége itt is kisebb rokonáénál, a fogassüllőénél (*Sander lucioperca*). Berinkey 1958-ban megjelent munkájáig a két fajt nem is különítették el a nagy hasonlóság miatt (Berinkey, 1958). Táplálkozási szokásait részletesen először magyar kutatók 2003-ban írták le a balatoni populációt vizsgálva. A ragadozó életmódot folytató hal ivadékként elsősorban zooplanktonnal és üledéklakó állatokkal (pl.: árvaszúnyog-lárvák) táplálkozik, majd különböző kisebb rák-fajokkal, innen tér át a kisebb halakra (pl.: dévérkeszeg (*Abramis brama*), vágódurbincs *Gymnocephalus cernua*), valamint a kannibalizmusra. Érdekes, hogy bár ez alapján a Balaton bőven tud táplálékot nyújtani neki, növekedési rátája mégis alacsony a tóban (Specziár & Bíró, 2003). Szintén Specziár és munkatársainak (2009) eredménye a 2009-ben kidolgozott morfológiai bélyeg rendszer, mely alapján a kősüllő és fogassüllő hibridje, az ún. fehér köves elkülöníthető a szülőfajoktól. Bár laboratóriumban sikeresen keresztezték, természetes körülmények között a két faj hibridjéről egészen 2008-ig nem érkezett jelentés. Az akkor a Balatonban fellelt egyed mind a morfológiai bélyegeket, mind a RAPD markerekkel vizsgált genetikai háttér alapján igazoltan a két faj hibridje volt. A kifogott egyed ráadásul tele volt ikrával, mely azt jelzi, hogy akár természetes körülmények között is van esély a termékeny hibrid létrejöttére. Az F1 generáció laboratóriumi körülmények között bizonyítottan fertilis (Müller et al., 2010). A hibrid halak veszélyt jelenthetnek a kiindulási fajok genetikai hátterének autonómiájára. A hibridek elkülönítésére szolgáló RAPD markerek mellett, csekély számban, de végeztek egyéb molekuláris vizsgálatokat is a kősüllőn az utóbbi évtizedben. Barmintseva és munkatársai (2014) Kazahsztánban a Balkas-tóban található kősüllő állomány diverzitását vizsgálták a mitokondriális Citokróm *b* régió, illetve mikroszatellit markerek alkalmazásával. A tóban élő süllő és kősüllő populációk genetikai polimorfizmusa mellett vizsgálták, hogy a Müller-féle hibridizációra alapozva előfordulhatnak-e hibrid egyedek a tóban, de a mikroszatellit lokuszok vizsgálatával egyetlen fehér kövest sem találtak.

### 2.3.2 A garda (*Pelecus cultratus*, Linnaeus, 1758)



3. ábra: A garda (Fotó: Molnár József)

A garda (3. ábra) hazánkban őshonos, közösségi jelentőségű halfaj. Rendszertani besorolása:

*Animalia* (Állatok királysága)

*Chordata* (Gerinchúrosok törzse)

*Vertebrata* (Gerincesek altörzse)

*Gnathostomata* (Állkapcsos gerincesek altörzsága)

*Pisces* (Halak főosztálya)

*Actinopterygii* (Sugaras úszójú halak osztálya)

*Cypriniformes* (Pontyalakúak rendje)

*Cyprinidae* (Pontyfélék családja)

*Leuciscinae* (domolykók alcsaládja)

*Pelecus* (garda nem)

*Pelecus cultratus* (Garda-faj)

A pontyfélék családja, több mint 340 genust foglal magába. Nem csoda, hogy az alcsaládok száma és filogenetikai struktúrája még a 2000-es években is vitatott volt. Éppen a gardát is magába foglaló *Leuciscinae* alcsalád taxonómiai elhelyezkedése volt az egyik kiemelten vizsgált kérdéskör (Cunha et al., 2012). Az 1980-as években molekuláris markerek híján a családokat még elsősorban morfológiai bélyegek alapján osztották alcsaládokra és alacsonyabb taxonómiai egységekre. Ilyen volt a pontyfélék családja esetében a bajusz megléte vagy hiánya (Winfield & Nelson, 1991; Coburn & Cavender, 1992). 1998-ban megjelent az első, a taxonómiai elkülönítésüket célzó molekuláris genetikai markerekkel végzett vizsgálat, ahol a mitokondriális genom Citokróm *b* régiója alapján több alcsaládra osztották a pontyféléket, és ezzel elvetették a korábbi besorolást (Briolay et al., 1998). A molekuláris módszerek fejlődésével a

pontyfélék családjának taxonómiai felosztása egyre tisztult, de a *Pelecus* genust is magába foglaló *Leuciscinae* alcsalád taxonjai még a 2000-es évekre is kérdésesek maradtak. A garda, nemének egyetlen tagja, pelágikus ikrarakó, anadrom halfaj, elsősorban a tengeröblök, torkolatok és nagyobb folyók hala. Feltehetően a Pannon-tengerből maradt a hazai és a környező országok vízrendszerében (Perényi & Bíró, 1991). Elterjedési területe napjainkban a Kaszpi-tenger és vízgyűjtője, az Ural és a Volga, a Fekete-tenger és a hozzá kapcsolódó vízterületek a Kubán-tótól a Dunáig, és a Balti-tenger az Oderával és a Nevával (Kujawa et al., 2013). A garda hazánkban is a 275/2004. (X.8.) kormányrendelet alapján a közösségi jelentőségű halfajok közé tartozik. Míg az 1800-as években olyan népszerűségnek örvendett, hogy a Balatonon külön halászati módszert dolgoztak ki fogására, a kótázást (Herman, 1887). Az 1900-as években az állomány létszáma csökkenésnek indult. Korponai és munkatársai (2011) kimutatták, hogy a garda állomány csökkenése ebben az időben olyan jelentős volt, hogy az egyik elsődleges táplálékuknak számító vízibolhák (*Bosmina* spp.) száma ezekben az években ugrásszerűen megnőtt. A következő nagyobb méretű pusztulás a Balatonban 2014-ben következett be. A halgazdálkodó több mint 20 000 elhullott egyed gyűjtött be. A pusztulás okát vizsgáló elemzések során több állat esetében is egy új herpesz vírust mutattak ki, ám mivel ez csak az esetek egyharmadánál volt fellelhető, az elhullást minden bizonnyal nem ez a vírus okozta (Dospoly et al., 2015). A FAO statisztikai adatai alapján az elhullás évében (2014) a hazai fogási mennyiség 4 t élősúly volt és jelentősebb növekedés nem is következett be (1. ábra), köszönhetően a hazai természetesvízi halászat betiltásának (2013 halászati törvény). Hazánk mellett Lengyelország a másik olyan ország, ahol kiemelt figyelmet szentelnek a gardának. Mivel a lengyel vörös könyvben a faj korábban a veszélyeztetett kategóriába tartozott (Kujawa et al., 2011), az ország a faj megmentése érdekében a mesterséges szaporítás módszerének kidolgozásába kezdett. Az eljárás egyik érzékeny pontja a lárva-neveléshez szükséges, megfelelő sótartalom meghatározása. A sótartalom növekedésével összefüggésben nőtt a lárvaformitások száma, a túl magas sótartalom pedig letálisnak bizonyult a fejlődő egyedekre (Kujawa et al., 2016). Bár Kujawa és munkatársai már a tenyésztésen dolgoznak, a garda a halászati kutatásokban még mindig az alulreprezentált fajok közé tartozik. A fent említett vizsgálatokon kívül még olyan környezeti vizsgálatok során foglalkoztak a fajjal, ahol a szervezetben a nehézfém tartalom felhalmozódását mérték (Zarei et al., 2011; Nowosad et al., 2019). Genetikai hátterét mindeztáig nem vizsgálták. Egy cseh kutatócsoport ugyan bevonta a fajt mikroszatellit markerek tesztelésébe, de csak kevés egyed, és a tesztelt 11 marker nem, vagy alig tűnt polimorfnek (Urbánková et al., 2013).



### 2.3.3 Az ezüstkárász (*Carassius gibelio*, Bloch, 1782)



4.ábra: Az ezüstkárász (Saját fotó)

Az ezüstkárász (4. ábra) egy a hazai vizekben szinte mindenhol megtalálható, omnivor, idegenhonos, invazív halfaj. Rendszertani besorolása:

*Animalia* (Állatok királysága)

*Chordata* (Gerinchúrosok törzse)

*Vertebrata* (Gerincesek altörzse)

*Gnathostomata* (Állkapcsos gerincesek altörzsága)

*Pisces* (Halak főosztálya)

*Actinopterygii* (Sugarasúszójú halak osztálya)

*Cypriniformes* (Pontyalakúak rendje)

*Cyprinidae* (Pontyfélék családja)

*Carassius* (Kárász nem)

*Carassius gibelio* (Ezüstkárász-faj)

Az ezüstkárász a legnagyobb létszámmal rendelkező édesvízi halcsaládnak, a pontyfélék családjának tagja (Nelson, 1994). Európában jelenlétét elsőként Közép-Európában írta le Bloch 1782-ben. Hazánkban az ezüstkárász nem őshonos, egyes források szerint 1954-ben hozták be az országba (Szalay, 1954). Más források szerint már korábban, az 1930-as években is fellelhető volt vizeinkben, azonban a fenotípusos hasonlóságok, és a nem egységes rendszertan miatt ekkor még nem tudták elkülöníteni közeli rokonaitól (Sallai, 1997). Herman Ottó könyvében egyes feltételezések szerint már 1887-ben írt róla, és a kövi kárász elnevezés könyvében valójában az ezüstkárászt takarta. A szerző akkor a fajt a széles kárász egy változataként írta le (Herman, 1887). A kárász nem tagjainak elkülönítése sokszor még ma is nehézkes a rendkívül nagy morfológiai hasonlóságok (Takada et al., 2010), és a nem tagjai között megfigyelt

hibridizáció miatt (Wouters et al., 2012.). Épp ezért az európai szintű elterjedésének folyamata is kérdéses. 1940-től kezdték el megjelenését feljegyezni először Bulgáriából, ahonnan hazánkba is került, majd Romániából, ahová feltehetően az orosz vizekből jutott el (Rylková et al., 2013). A taxonómiai kutatások során a molekuláris genetikai módszerek megjelenése sokat segített a kérdéskör tisztázásában. Kalous és munkatársai (2012) Csehországban morfológiai és merisztikus jellemzők alapján meghatározták az ezüstkárász neotípusát, mely alapján már könnyebben megkülönböztethető a kárász egyéb típusaitól. Az ezüstkárász gyors terjedésében minden bizonnyal segített a pontyfélék családjára is jellemző poliploidia ( $2n=100$ ,  $3n=150-160$ ) (Allendorf & Thorgaard, 1984). Az ún. *Carassius auratus*-komplex (Cac komplex) tagjainak jellemző ploiditási szintje, akárcsak taxonómiai besorolása és világszintű elterjedésük menete is vitatott kérdés volt még a 2000-es években is. 2001-ben Murakami és kutatócsoportja a Japánban található állományt vizsgálta és a mitokondriális genom elemzése alapján megállapították, hogy a japán vizekben előforduló kárászok 2 alfajra oszthatóak: az egyik a *Carassius auratus cuvieri*, a másik pedig a *Carassius auratus langsdorfii*. Ez utóbbit két további morfológiai változatra a *Carassius auratus burgerire*, és a *Carassius auratus grandocilusra* osztották fel (Murakami et al., 2001). Bár Murakamiék munkájában még nem, Takada és munkatársainak 2010-es publikációjában már megjelenik a *Carassius gibelio* is, mint a *Carassius auratus*-komplex tagja, és szemben a korábbival, a *C. a. langsdorfii*-t egyenlő taxonómiai szintre sorolják a *C. a. auratus*, a *C. a. cuvierii* és a *C. a. gibelioval* (Takada et al., 2010). Az utóbbi évek vizsgálati eredményei alapján az Európára jellemző „hexaploid” *Carassius gibelio* egyedek nagyobbra nőnek és jobban alkalmazkodnak a környezetükhöz (Zhou & Gui et al., 2017), mint a diploid egyedek. A biszexuális szaporodás mellett pedig egyes állományai uniszexuális, ginogenetikus szaporodásra is képesek (Zhou et al., 2000). Ennek során az ikrás által termelt triploid, vagy esetleg diploid oocitát a saját, vagy közel rokon fajok tejesei termékenyítik meg, azonban azok genetikai anyaga nem jut át a petesejtbe, így a keletkező utód az anya genetikai állományából származik (Komen & Thorgaard, 2007). Bár korábban azt feltételezték, hogy a *Carassius auratus*-komplex európai része valójában csak a diploid *Carassius auratus* és a ginogenetikus szaporodó, jellemzően triploid *Carassius gibelio*-ból áll, azóta az ezüstkárászból is több diploid állományt azonosítottak. A korábbi feltételezésekkel szemben, miszerint a triploid egyedek csak ikrások, triploid tejeseket is találtak (Jakovlic & Gui, 2011). Az ezüstkárász akár évente többször is képes ívni (Papadopol, 1982). Ez a reprodukciós tulajdonság az egyik oka annak, hogy ez az invazív faj ennyire sikeresen tud terjeszkedni vizeinkben, ezzel tavi környezetben komoly táplálék-konkurenciát jelentve olyan fajoknak, mint az őshonos ponty (*Cyprinus carpio*), vagy a széles kárász (*Carassius carassius*).

#### 2.4. A molekuláris genetikai markerek jelentősége és jellemzése

A biodiverzitás megőrzésének érdekében nemcsak a fajok számának megőrzésére kell törekedni, hanem hosszabb távon a megőrzendő fajok minél jobb egészségi állapotának és alkalmazkodó képességének fenntartására is. Ennek egyik feltétele, hogy genetikai hátterüket megismerjük, és azt kellő változatosságban megőrizzük, elkerülve ezzel a beltenyésztettséget és egyéb, az életminőségre negatív

hatással járó tényezőket. A molekuláris genetikai markerek a genetikai diverzitásvizsgálatok alapkövei. Míg kezdetben a populációk változatosságának mértékét a fenotípusos bélyegek alapján határozták meg, a technológia fejlődésével egyidőben sorra jelentek meg az újabb és újabb molekuláris markerek. Az újabb technikákkal és markerek megjelenésével azok felhasználási területei is egyre nőttek. A genetikai markerek lettek a géntérképezés eszközei, taxonómiai kutatások alapjai és a diverzitás kimutatásának eszközei minden rendszertani kategóriában.

#### 2.4.1. Alloenzimek

Az enzim polimorfizmusok a legkorábbi molekuláris markereknek tekinthetőek, melyek alkalmazása az 1980-as években kezdett elterjedni az akvakultúrában (May et al., 1980). Az enzimpolimorfizmusra épülő populációgenetikai vizsgálatok alapja, hogy az alloenzimek kodomináns öröklődésmentet követnek. Kimutatásuk munkaigényes, és más módszerekhez képes viszonylag nagy vizsgálati mintát és specifikus festési eljárást, szubsztrátot igényelnek. Az egyes fajokban kidolgozott eljárások azonban viszonylag könnyen ültethetők át más fajokra. A gélelektroforézissel az adott fehérje homo- és heterozigóta változata elkülöníthető (Hunter & Market, 1957). Az általános diverzitásvizsgálatok mellett biogeográfiai vizsgálatokhoz, illetve korábban ismeretlen növény- és állatfajok azonosításához is használtak alloenzimeket (Step & Kocher, 1997), azonban a módszert ilyen esetekben szubjektivitása miatt érdemes fenntartásokkal kezelni. Az értékelés szubjektivitása mellett az eredményeket befolyásolhatja a null allélok megjelenése, a fehérjék szövet specifikus jelenléte, valamint az esetleges eltérések a Mendeli öröklődéstől (pl.: mitokondriális fehérjék) (Kucuktas & Liu, 2007). Habár csökkent számban, de még napjainkban is alkalmazott technika. Az allozim vizsgálatokat elsősorban egyéb markerekkel kiegészítve alkalmazzák a genetikai diverzitás felmérését célzó kutatások.

#### 2.4.2 RFLP markerek

Az RFLP (Restriction Fragment-Length Polymorphism), ahogy az angol elnevezésből is következtetni lehet a restrikciós helyek polimorfizmusára épülő módszer. A vizsgálat során az egyedekből az azonos restrikciós enzimmel történő hasítás után kapott fragmenthosszt, mintázatot vetik össze és elemzik az eltéréseket. Kimutatásuk kezdetben Southern-blot analízissel történt, radioaktív próbák felhasználásával, azonban a PCR (polimeráz láncreakció) elterjedésével a vizsgálat olcsóbbá és egyszerűbbé vált (PCR-RFLP - Green, 1998). Az egyes polimorfizmusok így már egyszerűen agaróz gélen is kimutathatóvá váltak. Az eredmények kimutatását és értékelését megkönnyíti, hogy az egyes restrikciós polimorfizmusok könnyen detektálhatóak, nagy fragment méret különbségeket eredményeznek. Bár a kodomináns öröklődés és egyszerűsége miatt a PCR-RFLP ideális markernek tűnik, az alacsony polimorfítási szint miatt (általában csak 2 allél van) önmagában populációgenetikai diverzitásvizsgálatokhoz napjainkban sokkal alkalmasabb marker típusokat is találunk már.

#### 2.4.3 RAPD markerek

A RAPD (Random amplified polymorphic DNA) egy PCR alapú eljárás, ahol 10-12 bp hosszú szintetikus primerrel végzik az amplifikációt alacsony olvadási hőmérsékleten (Williams et al., 1990). A megfelelő hőmérséklet megválasztása után az oligonukleotid primerek több primer kötőhelyen feltapadnak a komplementer DNS-

re és a feltapadási helyek függvényében egyedi mintázatot hoznak létre. Egy reakció során több primer is használható, így még több lókuszt lehetséges detektálni (Kumari & Thakur, 2014). Mivel a primerek véletleszerűen kiválasztott szekvenciával rendelkeznek, előzetes genom ismeret nem szükséges a termék szaporításához, a templát DNS-rre sok helyen tapad fel a primer (a rövid szekvencia, alacsony hőmérsékleten) és két ellentétes szálú feltapadási pont között szaporodnak fel a különböző mérettartományhoz tartozó szegmensek. A variabilitást az így kapott ún. ujjlenyomat mintázat polimorf fragmentjei alapján határozzák meg (Welsh & McClland, 1990). A termékeket agaróz gélelektroforézis során különböző festékek, például etídium bromid segítségével lehet detektálni. Bár kimutathatóságának egyszerűsége és alacsony költségigénye miatt korábban népszerű genetikai markernek számított, a gyakorlatban alkalmazásakor figyelembe kell vennünk néhány, a technológiából adódó hátrányt, melyek miatt teljeskörű populáció-vizsgálatokra nem alkalmas. Az egyik legnagyobb probléma a RAPD markerek alkalmazhatóságával, hogy a reakció rendkívül érzékeny a körülményekre, ami jelentősen befolyásolja a reakciók ismételhetőségét és összehasonlíthatóságát a különböző vizsgáló laborok között. Emellett a fragmentek (markerek) recesszív-domináns öröklődés menetet követnek, vagyis a heterozigóta és homozigóta domináns genotípus nem különíthető el (Lynch & Millian, 1994). A gyakorlat napjainkban azt mutatja, hogy a RAPD markerek alkalmazása önmagában elsősorban populációk, fajok, hibridek és különböző vérvonalak elkülönítésére alkalmas, azonban átfogóbb populációgenetikai elemzésekhez célszerű például szekvenálási reakcióval bővíteni a vizsgálatokat (Ali et al., 2004).

#### 2.4.4. AFLP

Az AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) a RAPD-hoz hasonlóan a genom ismeretlen részeiből „ujjlenyomat” mintázatot eredményező eljárás, mely az 1990-es évek elején kezdett elterjedni. Az eljárás során a teljes genomot általában kettő restriktions endonukleázzal (Kumar et al., 2013) emésztik, majd a fragmentek végéhez adaptereket ligálnak, melyekhez a specifikusan horgonyzott oligonukleotid primerek (az ismert linker szekvencián 1-3 bp-al túlnyúló primerek) kapcsolódni képesek (Vos et al., 1995). A specifikus primerekkel ezt követően egy preszelektív PCR-t végeznek, majd a terméket hígítják és ezt követi egy újabb PCR. A primer kötődés után csak azok a fragmentumok szaporodnak fel, amelyekben az emésztési helyhez kötődő nukleotidok összeillenek a szelektív nukleotidokkal. A jelölt termékek méretét poliakrilamid gélen (PAGE), vagy kapilláris elektroforézissel detektálják (Matthes et al., 1998). A módszer legnagyobb előnye, hogy nagy számú polimorfizmus kimutatására alkalmas, és a PCR során alkalmazott hosszú oligonukleotidok miatt a reakciók könnyen megismételhetőek, habár tény, hogy drágább és időigényesebb például a RAPD módszernél. Akárcsak a RAPD, az AFLP is domináns-recesszív öröklődést mutat, ám a fragmenteket gélből visszaizolálva, szekvenáló reakcióval kiegészítve ez a hátránya kiküszöbölhető (Liu & Cordes, 2004).

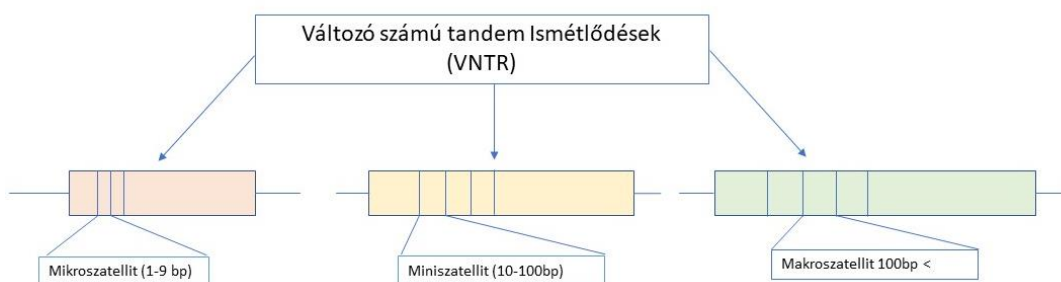
#### 2.4.5. Mikroszatellitek

##### Szatellitek

Mivel a molekuláris genetikai markerek közül kutatásomat részben mikroszatellit vizsgálatokra alapoztam, az alábbi marker típust az előzőeknél bővebben ismertetem.

A genomban található egymásután sokszor ismétlődő szekvencia egységeket szatellitoknak vagy VNTR-eknek (változó számú tandem ismétlődéseknek) nevezzük. Az ismétlődő egységek mérete és száma alapján egy ismétlődő egységet mikro- vagy miniszatellitnek nevezünk (5. ábra) eltérő a szakirodalmak szerint.

Az ismétlődő szekvenciareszek mérettartománya a mikroszatellitek esetében egy és tíz nukleotid között változik (Chambers & MacAvoy, 2000; Schlötterer, 2000; Vieira et al. 2016). Leggyakrabban, tandem ismétlődő di-, tri- tetra- vagy akár hexanukleotid szekvencia részletek, melyek legnagyobb számban a nukleáris genom nem kódoló régiójában helyezkednek el. Ritkábban ugyan, de promótereket, vagy intragenikus szegmenseket (általában tri nukleotid ismétlődés van ezekben) is érintenek (Vieira et al., 2016). Ilyenkor befolyásolják a génexpressziót, vagy hurkokat formázva a kromoszóma szerkezeti felépítésére is kihathatnak, például halak esetében a centromer kromatin állományának tömörségére (Martinez et al., 2001; Chistiakov et al., 2006). Attól függően, hogy az ismétlődő szekvenciában pontosan ismétlődnek-e az alap nukleotid egységek vagy az amplikon 1-1 bázissal eltér, különböztetünk meg perfekt és imperfekt mikroszatelliteket (Urquhart et al., 1994). Minél nagyobb az ismétlődő egységek száma, annál kevésbé stabil a mikrosatellit szerkezete és annál gyakoribbak az imperfekt szekvenciák. Méretük továbbá korrelál a mutációs rátával (Ellegren, 2004). A szakirodalomban a mikrosatellit markerek elnevezése sokszor nem egységes.

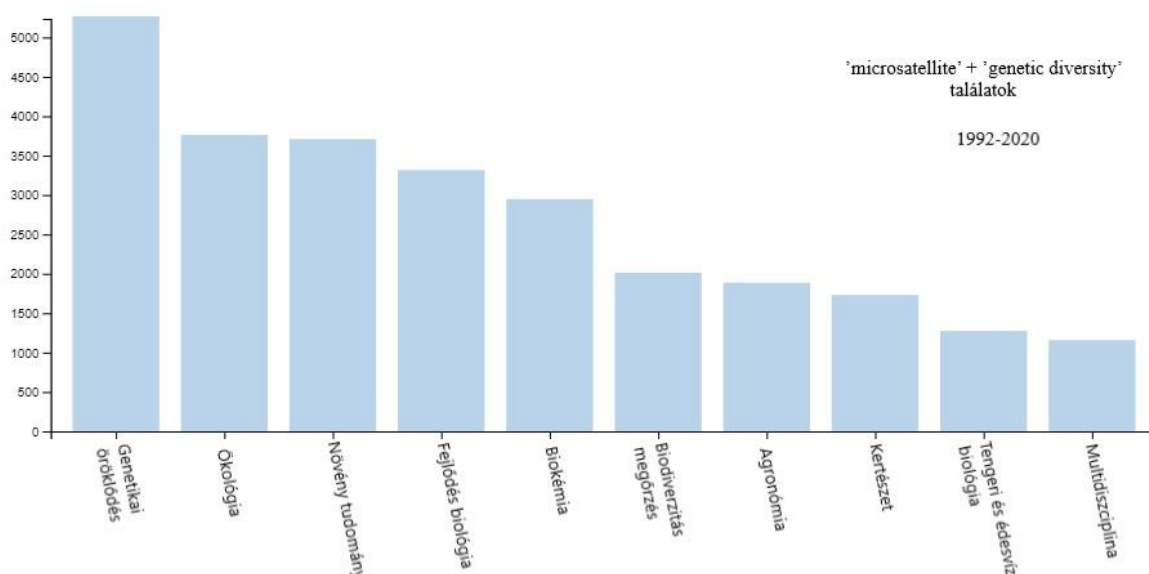


5.ábra A tandem ismétlődések típusai (saját ábra)

#### Mikroszatellitek a tudományos irodalomban

Chambers és MacAvoy 2000-ben készült átfogó tanulmányuk alapján az ismétlődő régiók egységes elnevezésének az angol VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) rövidítést javasolják Nakamura és munkatársai 1987-es munkája alapján, azaz változó számú tandem ismétlődésnek. A mikrosatelliteket pedig nem rövidítik, hanem a VNTR egyik típusaként tartják számon. Vieira 2016-ban szintén egy áttekintő cikkében már a rövidebb TR (tandem repeat) rövidítést használta, külön a mikrosatellitek ismétlődő régiójára pedig az SSR (Single Sequence Repeat) elnevezést (Vieira et al., 2016). Az SSR rövidítés, bár Chambers javasolta elvetését, már az 1990-es évek második felétől általánosan elterjedt, akár csak az STR (Short Tandem Repeat) és SSLP (Simple Sequence Length Polymorphisms) (McDonald & Potts, 1987). Mind az öt rövidítést alkalmazzák mikrosatellitekre, de sok esetben beleértik a rövidebb miniszatelliteket is, melyek azonban eltérő mérettartományúak (5. ábra). Állatok esetében a leggyakoribb a CA dinukleotid ismétlődése (Rohrer et al., 1994). Megfigyelték, hogy az ismétlődő egységek mérete és az ismétlődések száma nem teljesen rendszertelen. A gerincesekben hosszabbak és gyakoribbak, közülük is a

változó testhőmérsékletű állatok esetében a leghosszabbak (Chambers & MacAvoy, 2000). Kialakulásukra több elmélet van, amelyek közül a legelfogadottabb, hogy a DNS replikáció során „megcsúszó” DNS polimeráz enzim, és a replikáció során fellépő hibásan működő javítási mechanizmus felel keletkezésükért, és az allélok kialakulásáért. A minden eukariótában, és ritkábban ugyan, de prokarióta szervezetekben is előforduló ismétlődő szekvencia elemek populációgenetikai vizsgálatokra való alkalmasságáról először 1989-ben jelentek meg közlemények (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989), habár magának az ismétlődő régióknak a jelenlétét már 1984-ben leírták az emberi mioglobin gén kapcsán (Weller et al., 1984). Egy 2016-os kutatás adatelemzése alapján Litt-ék művének megjelenésétől számítva 44 000 tudományos közlemény látott napvilágot mikroszatellit témában (Ibrokchim, 2016). Jelenleg a Web of Science adatbázisában 1992-2020 között 20170 tudományos közlemény található a 'microsatellite' és 'genetic diversity' kifejezések együttes szűrésére, ebből 1241 tengeri és édesvízi biológia témakörben (6.ábra).



6. ábra: Tudományos publikációk a Web of Science adatbázisban 1992-től 2020-ig a „microsatellite” és „genetic diversity” kifejezések együttes megjelölésével

#### Mikroszatellitiek izolálása és kimutatása

A mikroszatellitiek izolálásának és kimutatásának napjainkban két formája a legelterjedtebb, a korábban alkalmazott könyvtárkészítés és Sanger szekvenálás, valamint a napjainkban a helyét egyre inkább átvevő új generációs szekvenálási eljárások (Vieira et al., 2016). A mikroszatellitiek izolálásának szekvencia ismeret nélküli első lépése a könyvtárkészítés. Ehhez a genomot restrikciós endonukleázokkal emésztik, majd gélből a kb. 300-500 bp hosszú fragmenteket izolálják, és az így keletkezett termékeket vektorba ligálják, majd kompetens sejtek segítségével előállítják a klónkönyvtárat. A könyvtárból különböző oligonukleoid próbák segítségével (Rassmann et al., 1991) kiválasztják az ismétlődést tartalmazó szekvenciákat, és egyedi tervezésű primerekkel a PCR során felszaporítják a vizsgálni kívánt régiót. A primer tervezés egyik nehézsége a mikroszatellit markerek esetén, hogy a genom nem kódoló régiójában jóval gyakrabban fordul elő bázis szubsztitúció (Zane et al., 2002). Ez nemcsak a primerek megtervezését, de ahogy az a későbbiekben láthatóvá válik, a közeli rokon fajok közötti adaptációját is nehezíti. A különböző populációgenetikai számítások alapját a PCR során felszaporított termék hossza, azaz az egyes allélok mérete adja. Egy allél hossza, mely az ismétlődések számától függ nagyban befolyásolja mutációs rátáját és egyéb olyan tulajdonságait is a lokusznak,

mint például a polimorfitás (Kayser et al., 2006). Az allélok detektálása kezdetben elsősorban szekvenáló gélen történt autoradiográfiával. A termék méreteket a szintén géltre felvitt molekulásúly markerhez viszonyítva határozták meg. Ez a detektálási módszer több napot is igénybe vett, és a radioaktív anyagok miatt szigorú biztonsági intézkedéseket követelt a laboroktól (Litt & Luty, 1989). A 90-es években a radioaktív izotópok használata után terjedt el az ezüstoffestéses jelölési módszer, és a poliakrilamid gélek alkalmazása (Christensen et al., 1999). Napjainkban a mikroszatellit markerekkel történő vizsgálatok során pedig a leggyakoribb DNS jelölési mód a fluoreszcens jelölés, melynek detektálása és pontos mérettartomány meghatározása automata szekvenálók segítségével történik. Az allélméreték azonosítására, elemzésére a kapilláris gélelektroforézisek, a Sanger szekvenálás és az új generációs eljárások esetén is már számos algoritmus és szoftver (GeneMapper (Currie-Fraser et al., 2010), Tandem Repeat Finder (Benson, 1999), TROLL (Adalberto et al., 2002)) áll a kutatók rendelkezésére (Gemayel et al., 2010). A mikrosatelliteket a mendeli öröklődés, a magas allélszám, és az őket jellemző szintén magas polimorfizmus teszi kiváló eszközeivé a genetikai diverzitásvizsgálatoknak.

#### 2.4.6 SNP markerek

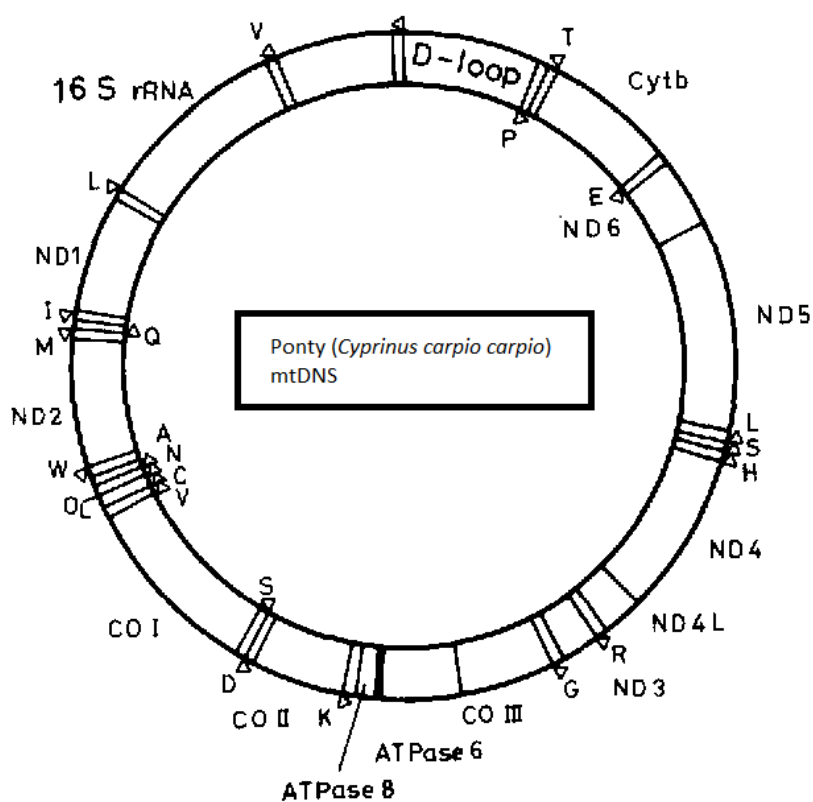
A bioinformatika tudományterületének fejlődése, a DNS chipek megjelenése és az új generációs szekvenálási módszerek elterjedése a populációgenetika területén új dimenziókat nyitottak meg a genetikai markerek használatában. Lehetővé vált az SNP-k (single nucleotide polymorphisms), azaz az egy nukleotid eltérést hordozó polimorfizmusok tömeges detektálása. Kimutatásukra korábban többféle módszert is alkalmaztak, mint a DNS kromatográfia (Hecker et al., 1999), reverz dot-blot analízis (Saiki et al., 1989), de napjainkban a legelterjedtebb és legpontosabb eredményt hozó módszer a direkt szekvenálás (Liu & Cordes, 2004). A napjainkban használt elemzések közül a hibridizáláson alapuló módszerek (Gén chipek - Taub et al., 2009), DASH (Dynamic allele-specific hybridization - Prince et al., 2015), Taqman (Holland et al., 1991), PNA (Peptid Nucleic Acid - Nielsen et al., 1991)) és LNA (Locked Nucleic Acid - Johnson et al., 2004) próbák, stb. mellett a legtöbb módszer magába foglalja a célszekvencia felszaporítását (PCR), majd ezt követően a szekvenciák megkülönböztetésére szolgáló restrikciós enzimek, vagy oligonukleotid próbák alkalmazását (Landegren et al., 2018). Oligonukleotid próbákat alkalmazó genotipizálást használnak a különféle DNS-chipek (OLA: Oligonucleotide Ligation Assay, Black et al., 2006) esetén. Ezek az eljárások nagy áteresztőképességűek és változatos vizsgálati formák. A 2000-es évek óta többféle próba típus is elterjedt az SNP genotipizálásokra, mint a padlock próbák (Baner et al., 2003), vagy a cirkuláris oligonukleotid próbák (Pickering et al., 2002) alkalmazása. Az oligonukleotid ligálást használó módszerek mellett külön csoportot alkotnak a primer extenzióra alapuló eljárások, melyek a hibridizálásnál pontosabb genotipizálási lehetőséget nyújtanak. Primer extenziós jelölés detektálásán alapul a piroszekvenálás (Ronaghi et al., 1998), a különféle fluoreszcens polarizációra épülő módszerek (Hsu et al., 2001; Jameson & Ross, 2010), a SnapShot kitek használata, valamint különféle DNS-chipes módszerek (Gabriel & Ziaugra, 2004; Tebbutt et al., 2004; Podder et al. 2008; stb.) is. Az SNP markerek öröklődő, kodomináns markerek, melyek kimutatási protokollja jóval könnyebben standardizálható az egyes laboratóriumok között, mint például a mikrosatelliteké, viszont az allél diverzitásuk jelentősen kisebb (Freamo et al.; 2011). Az SNP-k többnyire csak 2 allélosak, szemben a rendkívül polimorf mikrosatellit ismétlődésekkel, ahol halak esetében akár 20-30 allél is kimutatható egy-egy populációból. Ennek köszönhetően azonos felbontású vizsgálatához jóval nagyobb számú SNP vizsgálatára van szükség, mint mikrosatellitekre. A kisebb allél diverzitás



ellenére az SNP markerek végkimenetele igen nagy mennyiségű adat, melyek kiértékelése jóval bonyolultabb, mint a mikroszatellit adatok elemzése.

#### 2.4.7 Mitokondriális DNS markerek

A mikroszatellitek mellett kutatásom másik alapja a mitokondriális genom szekvencia elemzése, és alkalmazásuk molekuláris genetikai markerként. A mitokondriális markerek népszerűségét jól mutatja, hogy már 2015-ben is több, mint 5300 komplett mitokondriális genom volt elérhető a Genebank adatbázisában. Az első nem vírus genom is, amit megszekvenáltak, mitokondriális DNS volt, méghozzá a humán 1981-ben (Anderson et al., 1981). Az állatok szervezetében a mitokondriumnak számos szerepe van, többek között részt vesz a sejt metabolizmusban, az apoptózisban, szerepet játszik az öregedésben és betegségek kialakulásában (Boore, 1999). Az emlősökben 15 500-16 800 bp hosszú, többnyire ugyanazt a 37 gént kódoló genom (2 rRNS, 22 tRNS és 13 polipeptid) 10-től több ezer kópiában fordulhat elő a sejtekben (7. ábra). A nagy kópiaszám miatt a korábban felsorolt élettani hatásokat okozó mutációk sokáig halmozódnak, mire láthatóvá válik hatásuk (Burger et al., 2003).



7. ábra: A ponty (*Cyprinus carpio carpio*) mitokondriális genom szerkezete (Chang et al., 1994)

A molekula cirkuláris, rendkívül ritka esetekben - például néhány alga és medúza fajnál - lineáris (Bridge et al., 1992; Vahrenholz et al., 1993; Kayal et al., 2011). A haploid mitokondriális genom (7. ábra), szemben a nukleáris genommal, anyai öröklődést követ. Bár a megtermékenyítéskor még jelen van az apai mitokondrium, a zigótákban eliminálódik, és a továbbiakban az utódokban már csak az anyai mitokondrium található meg (Ankel-Simons & Cummins, 1996). Szintén a mitokondriális genom sajátossága, hogy jóval nagyobb evolúciós rátával rendelkezik, mint a nukleáris genom. A magasabbrendű gerincesekben ötször nagyobb a mutációs rátája, mint a sejtmagi genomé (Brown et al., 1974), köszönhetően például az oxigén redukció során keletkező szabadgyököknek (Lagouge & Larson, 2013), és a hiszton



védelem hiányának (Ballard & Whitlock, 2004). Nem rekombináldik, így kiváló eszköze a különféle filogenetikai kutatásoknak. További előnye a nukleáris markerekkel szemben az intronok hiánya (Herbert et al., 2003).

A mitokondrium maternális öröklődésének korábban feltételezett oka, hogy a megtermékenyítés során a hímivarsejt nyaki része, mely a mitokondrium-állományt tartalmazza, nem jut be a petesejtbe, vagy ha be is jut, mint a halak esetében, az anyai mitokondriális DNS mennyiségi túlsúlya miatt nem detektálható (Hutchison et al., 1974). Ezt az elméletet a későbbiekben felülírták, mikor rájöttek, hogy az apai mitokondriális degradációjáért a spermium ubikvitin tartalma felel (Thompson et al., 2003). A mitokondriális genomhoz kötik a kutatók az ún. „anyaátok” jelenséget is (Wolff & Gemmel, 2013), melynek alapja, hogy a mitokondriális genomban felhalmozódó mutációk súlyosabb hatással vannak a hímekre, azokban a speciális gének expresszióját jobban befolyásolják (Ballard & Pichaud, 2014). Speciális öröklődése miatt teljeskörű populációgenetikai diverzitásvizsgálatra önmagában ez a marker típus sem alkalmas, azonban a fajok azonosítására, különböző vérvonalak, populációk kialakulásának, migrációjának vizsgálatára kiválóan alkalmas markerek. Igazolták, hogy a mitokondriális diverzitás az allozim markereknél jobban tükrözi az effektív populáció méretet, illetve változatai jól reflektálnak az adaptív evolúcióra (Nabholz et al., 2007). Kimutatásuk korábban restriktions hasítási helyek vizsgálata alapján történt (PCR-RFLP), napjainkban azonban legáltalánosabban PCR-t követő direkt szekvenálási reakcióval végzik. Halak esetében a populációgenetika területén a három leggyakrabban vizsgált régió a mitokondriális genom nem kódoló kontroll régiója a D-loop régió, a Citokróm *b* és a Citokróm oxidáz 1 gének. Utóbbi kettő az oxidatív foszforilációért felelős génkomplexum részei. Kezdetben leggyakrabban a kutatók a D-loop régiót vizsgálták, mely a mitokondriális genomban lezajló transzkripciót, replikációt és iniciációt is szabályozó régió, és egyben a legnagyobb nem kódoló DNS szakasz a molekulán. Ez utóbbinak köszönhetően ez a szakasz mutatja a legnagyobb szekvencia változatosságot is (Billington & Hebert, 1991).

## 2.5. Molekuláris genetikai markerek alkalmazása az akvakultúrában és természetes vízi állományok vizsgálatában

A molekuláris genetikai vizsgálatok viszonylag hamar elterjedtek a halas kutatásokban (Sick, 1961; Ligny, 1969; Ward & Grewe, 1994). Ahogy korábban a markereket taglaló fejezetben is említettem, a halak esetében is elsőként a különböző enzim változatokkal, az ún. alloenzimekkel végzett vizsgálatok jelentek meg. Elsősorban fajok, valamint populációk közötti diverzitást vizsgáltak velük (May et al., 1980; Taggart et al., 1980; Tessier et al., 1995; Stockwell et al., 1996), de már ekkor felismerték a módszer korlátait, úgymint a nem kellően magas polimorfizmus, így az idő előrehaladtával más genetikai markerek kerültek előtérbe. Az allozim vizsgálatok a populációgenetikában csak, mint kiegészítő vizsgálatok maradtak meg. Hasonlóképp népszerű módszer volt, elsősorban populáció genetikai diverzitás és géntérképezési vizsgálatokhoz, a 90-es évektől, sőt még a 2000-es évek elején is, a RAPD módszer. 1993-ban Bardacki és munkatársa nílusi tilápián (*Oreochromis niloticus*) végeztek diverzitásvizsgálatot velük. Bár a RAPD markerek alkalmasak voltak a populációk elkülönítésére, de nem minden változat esetén. A nílusi tilápia változatok elkülönítésére a mitokondriális genom vizsgálata hatékonyabbnak bizonyult. Önmagában tehát a RAPD markerek sem bizonyultak elegendőnek a tilápia esetén,

viszont a mitokondriális genom vizsgálata, tekintve maternális öröklődését, a hibrid vonalak elkülönítésének esetében bizonyult használhatatlannak. A megoldást a két módszer együttes használata jelentette, mert együtt már alkalmasnak bizonyultak a fajok, alfajok és hibridek elkülönítésére is (Bardacki & Skibinski, 1994). A RAPD markerekkel együtt kezdett elterjedni a PCR alapú RFLP markerek használata is, elsősorban a mitokondriális genom génjeinek hasítási helyeit vizsgálva (Hansen et al., 1995; Toline & Baker, 1995; Taylor et al., 1997; Imsiridou et al., 1998; Mesquita et al., 2000; Madeira et al., 2005). A technikát több esetben korábbi allozimes vizsgálatok kiegészítéseként, illetve eredményeiknek megerősítéseként alkalmazták a kutatók (Toline & Baker, 1995; Triantafyllidis et al., 1999). Legtöbbször az eredmények alátámasztották az allozimek által meghatározott differenciáltságot (Triantafyllidis et al., 1999), valamint bebizonyosodott, hogy a PCR-RFLP markerek a közelebbi taxonómiai csoportok elkülönítésére alkalmasabb eszközöknek bizonyulnak (Imsiridou et al., 1998). A PCR alapú restriktions vizsgálat Magyarországon is elterjedt molekuláris módszer. Itthon PCR-RFLP markerekkel vizsgáltak többek között természetesvízi, és tenyésztett sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) állományokat (Ósz et al., 2018), a szarvasi Halászati Kutatóintézet génbankjában fenntartott dunai- és tiszai vadponty vonalakat (Lehoczky et al., 2005), és európai angolna (*Anguilla anguilla*) ivadékokat is (Kolics et al., 2015). Míg a magasabb taxonómiai egységek közötti elkülönítésekben a PCR-RFLP megjelenése okozott igazi áttörést, addig a populációk és egyedek közötti differenciáltság szintjén a mikroszatellit markerek megjelenése bizonyult úttörő módszernek. Hallerman és Beckmann (1988) egy átfogó tanulmányt adott ki a haltudományok területén alkalmazott DNS szintű polimorfizmus vizsgálatokról. Ebben többek között kiemelik, hogy a halas szakmában az ezredfordulón a markereken alapuló gyakorlati módszerek alkalmazása még mindig nem volt túl gyakori, és először említették meg a mikroszatellitek adaptálásának lehetőségét a halas kutatásokba. 1993-ban az elsők között Estoup és munkatársai (1993) sebes pisztrágon vizsgálták az új marker típusok alkalmazhatóságát, majd később bővített eredményeiket korábbi allozimes vizsgálataikkal is összevetették, ahol a magasabb mutációs rátával rendelkező mikroszatellitek jóval nagyobb diverzitást tártak fel a populációk között (Estoup et al., 1998). A sebes pisztráng mellett, a lazacfélék egy másik faja, a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) is az első mikroszatellitekkel vizsgált halfajok között volt. O'Connell és munkatársai (1996) az Ontario tóban fellelhető populációk genetikai differenciáltságát vizsgálták. Kutatásaik alapján 1997-ben O'Connell és Wright közösen publikálták az első áttekintő cikket a mikroszatellit markerek használatáról halakon. Még ebben az évben megjelent egy másik munka, melyben pontyok genetikai diverzitásvizsgálatához izoláltak és alkalmaztak mikroszatellit markereket (Crooijmans et al., 1997). A kutatásuk során izolált mikroszetellit szett tagjait a későbbiekben több a pontyokon, illetve pontyféléken végzett genetikai diverzitásvizsgálat során alkalmazták és alkalmazzák napjainkig (Ludanny et al., 2010; Janson et al., 2015; Yadav et al., 2020). Köztük hazai kutatásokban is (Bártfai et al., 2003; Lehoczky et al., 2005). Azt, hogy a módszer milyen gyorsan terjedt a halas vizsgálatokban, jól bizonyítja DeWoody 2000-ben, alig 3 évvel az első halas mikroszatellit vizsgálatok után megjelent áttekintő publikációja, amiben az adatbázisok alapján már akkor 73 releváns publikációt talált. Ezekben együttesen több, mint 500 markert alkalmaztak (DeWoody & Avise, 2000). A 2000-es évekbe lépve már komplexebb problémák megoldására is elkezdtek vizsgálni ennek a markertípusnak az alkalmazhatóságát halak esetén. Hansen és munkatársai 2001-ben

mikroszatellit adatok alapján kerestek elemzési módszereket, amelyekkel egy-egy származását tekintve ismeretlen egyed valamely populációba besorolható. Vizsgálatuk nyomán egy, a populációgenetika területén jól használható módszertan született. Mccusker és Bentzen (2010) pedig azt vizsgálták, milyen összefüggések találhatóak szakirodalmi áttekintés alapján a mitokondriális és mikroszatellit diverzitási adatok, és egy-egy halállomány tényleges mérete között. Megfigyeléseik alapján, míg a tengeri halaknál a mikroszatellitekkel mértek magasabb diverzitási értékeket, addig édesvízi fajok esetében a mitokondriális genomból származó adatok hoztak magasabb diverzitási értékeket. Magyarországon a korábban említett pontyokon történt vizsgálatokon felül, többek között sebes pisztrángokon (Ősz et al., 2018), süllőn (*Sander lucioperca*) (Kánainé et al., 2019a) és afrikai harcsán (*Clarias gariepinus*) (Kánainé et al., 2019b) is végeztek mikroszatellit tesztek. 2019-ben egy szlovák kutatócsoport (Pekárik et al., 2019) gyűjtött többek között a Duna hazai és szlovák szakaszáról kecsege mintákat, hogy felmérjék a napjainkra veszélyeztetett, a Vaskapu megépülése óta a tokfélék közül a Dunában legnagyobb számban fellelhető halfaj, vad- és tenyésztett állományainak genetikai diverzitását. A Citokróm *b* (Cyt.B) és a Citokróm oxidáz 1 (Co.I.) a halak populáció genetikai vizsgálataiban a kontroll régió (D-loop) mellett leggyakrabban markerként alkalmazott szekvenciák. Míg azonban a kontroll régiót inkább populációk között és azokon belül, az egyedek közti diverzitás mérésére, a haplotípusok elkülönítésére alkalmazzák, addig a Cyt.B és a Co.I. magasabb taxonómiai szintű vizsgálatokban kap például fajtaazonosító szerepet (Tobe et al., 2009). A mitokondriális genom diverzitását vizsgáló módszerek kezdetben elsősorban PCR-RFLP módszereken alapultak. Avise és munkatársai angolnák genetikai diverzitását vizsgálták a mitokondriális genom restrikciós változatai alapján. A katadróm élelciklust folytató hal esetében, bár a földrajzi távolságokból adódóan számítanának rá, mégsem volt nagy a differenciáltság a populációk között (Avise et al., 1986). Akárcsak a mikroszatelliteknél, a lazacfélékhez tartozó pisztrángok, a mitokondrium alapú populációgenetikai vizsgálatokban is elsőként kerültek a kutatók látcsövébe. 1992-ben Bernatchez és munkatársai elsőként alkalmazták a kontroll régió (D-loop) szekvenálását genetikai diverzitásvizsgálatra sebes pisztrángoknál. A fenotípus és filogenetika közötti kapcsolatok felderítése mellett arra is kíváncsiak voltak, hogy a PCR alapú szekvenálással kapott eredmények mekkora összhangban állnak a korábbi allozim alapú vizsgálataikkal. A két módszer közötti átfedés megerősítette a mitokondriális marker alkalmazhatóságát a diverzitás-vizsgálatra is. A PCR-t követő szekvenálás a diverzitás-vizsgálatok mellett kiváló eszköze a faj azonosításnak is (Balitzki-Korte et al., 2005). Bernatchezék később a PCR-RFLP módszerrel vetették össze a szekvenálás alapú technikát pataki szajbling (*Salvelinus fontinalis*) vizsgálata közben. Érdekes, hogy ebben az esetben a mérőszámok feleakkora diverzitást mutattak ki, mint az RFLP esetén (Bernatchez & Danzmann, 1993). A két eljárás közötti különbségeket, és alkalmazásukban rejlő lehetőségeket jól bemutatja és összehasonlítja egy 2009-es áttekintés (Teletchea, 2009). Teletchea munkája 153 cikk alapján veti össze a halas kutatásokban alkalmazott markereket. A vizsgált régiók megoszlásában magasan a mitokondriális genom Citokróm *b* régiója állt, mint a legtöbbet elemzett a markerek között. A 2007-ig tartó időszakban az irodalmi adatok alapján a taxonómiai azonosításokhoz is a leggyakoribb technika a PCR-RFLP, majd a PCR-t követő szekvenálás. A két eljárás elsősorban nem egymás helyettesítésére, hanem inkább kiegészítésére szolgál, hiszen míg az RFLP módszer gyors és olcsó detektálást tesz

lehetővé, addig a szekvenálás alapú markerezés az eredményezett adatmennyiséggel múlja felül a másikat. Ezek a módszerek nemcsak a mitokondriális, hanem a nukleáris genom vizsgálatára is hatékonyan alkalmazhatóak, így például a PCR-RFLP remekül alkalmazható hibridizációk kimutatására (Sriphairoj et al., 2018), míg a szekvenálás új allélok, génváltozatok keresését teszi lehetővé.

## 2.6. Populációgenetikai számítások a genetikai diverzitás felméréséhez

Akárcsak a molekuláris genetikai markerek megválasztásakor, az adatok kiértékeléséhez szükséges különböző szoftverek, statisztikai alkalmazások és alkalmazott matematikai modellek megválasztásakor is körültekintően kell eljárunk. Mivel jelen munka során a mitokondriális és mikroszatellit markerekkel elsősorban populációkon belüli, és azok közötti összefüggéseket vizsgáltunk, így ebben a fejezetben elsősorban az ezek értékeléséhez szükséges módszereket, és a hozzájuk kapcsolódó mérőszámokat tekintem át. Az alábbi módszerek tehát elsősorban a dolgozatban is alkalmazott mikroszatellit és mitokondriális markerekhez köthetőek. Míg a mikroszatellitek esetében a változatosságot az egyes lókuszhoz tartozó allélméretek, addig a mitokondriális markereknél közvetlenül a bázis polimorfizmusok adják, és az ezek alapján meghatározott haplotípus csoportok képezik a fő elemzési egységeket. A kiválasztott módszerek alkalmazhatóságát a különböző halfajokban korábbi vizsgálatok is alátámasztották (Liu & Cordes, 2004).

### 2.6.1. Populációgenetikai számítások a mikroszatellit markereknél

A molekuláris genetikai markerekkel nyert adatokból, a mikroszatellit markerek esetén az első lépés a lókuszonkénti allélok számának és frekvenciájának meghatározása, melyből aztán a heterozigotizációs értékek kiszámíthatóak. Az allélméretek meghatározása egy kritikus pont a mikroszatellit vizsgálatok esetében. A rosszul meghatározott genotípus az allélméretek alapján kihat az allélgyakoriságra és frekvenciára, ezáltal a heterozigotizáció mértékére. A rosszul meghatározott homozigóta arány pedig hat a Hardy-Weinberg egyensúlyra, és a beltenyészettesség szintjére (Bonin et al., 2004). A polimorf információs tartalom (PIC érték) annak a valószínűségét írja le, hogy egy adott utódban az anyai és apai eredetű allélok egyértelműen azonosíthatóak. Értéke az allélszámok és a megfigyelt allél gyakoriságok alapján a következő képlettel számítható ki:

$$PIC = 1 - \sum_i p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

, ahol  $p_i$  az  $i$ -edik allél frekvenciája,  $p_j$  a  $j$ -edik allél frekvenciája,  $n$  pedig az allélszám. Ha értéke 0,5 fölötti tartományba esik, az adott marker nagyon informatív, 0,2 és 0,5 között mérsékelten, míg 0,2 alatt kevésbé informatív (Botstein et al., 1980). Utóbbi tartományba eső markereket önmagukban, vagy kevés marker esetén nem érdemes diverzitásvizsgálathoz alkalmazni. A heterozigotizáció, vagy Nei-féle géndiverzitás mérőszáma annak a valószínűségét mutatja, hogy tetszőleges lókuszon a populációból két véletlenszerűen kiválasztott allél különbözik. Egy állandó nagyságú populációban egy semleges lókuszt várt heterozigotizációját a következő képlet adja meg

$$4Nv/(4Nv + 1)$$

, ahol  $N$  az effektív populáció méret,  $\nu$  pedig a generációnkénti mutációs ráta per lókuszt (Kimura, 1968). A heterozigóta egyedek jelenlétének fontossága egy populációban már az allozim vizsgálatok óta ismert, ahol több fehérje vizsgálata során is pozitív korrelációt mutattak ki a heterozigotitás és egyes fenotípusos tulajdonságok között (Mitton & Grant, 1984). A heterozigotitási szint és a populációkat jellemző fitness összefüggésének mutatója a HFC (heterozygosity-fitness correlations) érték. Az érték arra a hipotézisre ad választ, mely szerint a heterozigóta lókusztok nem véletlenül párosodnak a fitnesshez kapcsolt lókusztokkal (Chapman et al., 2009). Egy populációban a biotikus tényezők, mint az életkor, fejlődési stádium, stb. mellett a heterozigotitás, és a populációkban megjelenő kedvező tulajdonságok közötti összefüggés alakítja ki a heterozigóta fölényt. A lecsökkent heterozigóták és megnövekedett homozigóták arányából fakadó beltenyésztettség egy populációban annak összeomlásához vezethet (Wang et al., 2001).

A várt ( $H_e$ ) és becsült ( $H_o$ ) értékéből tudunk következtetni egy populáció Hardy-Weinberg egyensúlyhoz való viszonyára (HWE). A Hardy-Weinberg modell, az ideális populáció modellje a populációgenetikában, ami referencia pontként szolgál, és ami alapján a populáció genetikai hátterére ható tényezők hatásai felismerhetőek és megbecsülhetőek (Mayo, 2008). A Hardy-Weinberg szabályt, mely az ideális populáció állapotát jellemzi, egymástól függetlenül 1908-ban írta le Hardy (Hardy, 1908) és Weinberg (Weinberg, 1908). Munkáik alapján az ideális populáció kritériumai a végtelen nagy egyedszám, a véletlenszerű szaporodás, valamint a külső és belső hatások, mint mutáció, szelekció és migráció hiánya, így az allélgyakorosság generációról generációra állandó marad. A valóságban minden pontnak megfelelő populáció nem létezik. A külső hatások által egy populációba bejutó allélok mellett, a mutációk során allél-keletkezéssel is megjelenhetnek mérhető különbségek. Az ilyen bázis különbségek alapján szekvenálással azonosított ortológ génekből, akár evolúciós hatásokra is következtethetünk (Albalat & Canestro, 2016).

A populációkban az idő során lókuszonként felhalmozódó allélkülönbségek alapján 1972-ben Nei meghatározta a genetikai távolság mérőszámát ( $D$ ) (Nei, 1972). A genetikai távolság Nei-féle értéke általában 0 és 1 közé esik. Minél közelebbi értéket vesz fel a nullához, annál alacsonyabb a differenciáltság a párba állított populációk között. A populációk differenciáltságának mérésére szolgál az ún. fixációs index, vagy másnéven Wright-féle  $F$ -statisztika értéke is (Wright, 1922). Az index három variancia értékéből épül fel, a populációk közötti ( $F_{st}$ ), a populáción belüli ( $F_{is}$ ) és a teljes genetikai varianciából ( $F_{it}$ ), mely értékek tulajdonképpen a populációk heterozigóta és homozigóta egyedeinek gyakoriságára épülnek. A módszernek napjainkra több kiterjesztett, és vizsgálat specifikus változata jelent meg. Az első kiterjesztett változat Nei nevéhez köthető. Az általa meghatározott  $G_{st}$  tulajdonképpen több lókuszt esetén az összes allél  $F_{st}$  értékének mediánja (Nei, 1973). Ezt követte időrendi sorrendben a nagyon variábilis mikroszatellit marker eredmények elemzéséhez a Slatkin által közölt  $R_{st}$  érték (Slatkin, 1995). Utóbbi alkalmazása nem terjedt el annyira, mint az  $F_{st}$  vagy a  $G_{st}$  által mért differenciáltság. Mivel ezek pontossága több áttekintő munka alapján megkérdőjelezhető (Heller & Siegmund, 2008; Liang et al., 2015), a minél egzaktabb eredmény eléréséhez jelentek meg olyan korrigációs értékek, mint a Jost-féle ' $D$ ' érték (Jost, 2008).

## 2.6.2. Populációgenetikai számítások a mitokondriális markereknél

A mitokondriális markerek szekvencia analízise alapján számított szekvencia diverzitás, és a polimorf populációk számából határozhatjuk meg a populációkat jellemző nukleotid diverzitás ( $\pi$ ) értékét, az alábbi képlet alapján

$$\pi = \pi^* / L$$

, ahol  $L$  a pozíciók száma,  $\pi^*$  pedig a szekvencia diverzitás értéke, ami a szekvenciák száma és a szekvencia páronkénti genetikai távolság értékéből számítható ki

$$\pi^* = \frac{2}{n(n-1)} \sum_{i < j} d_{ij}$$

ahol  $n$  a szekvencia szám,  $d_{ij}$  az  $i$  és  $j$  szekvenciák közötti genetikai távolság (Nei & Li, 1979).

A genetikai távolságok szemléltetésére készülnek a különböző taxonómiai egységek kapcsolatát bemutató törzsfák (phylogram) és kladogramok (Platnick, 1977). A kladogram a filogenetikai fák olyan változata, mely csak a rokonsági kapcsolatokat fedi fel, evolúciós információval nem rendelkezik, mivel az ághossz nem informatív. A törzsfák segítenek az evolúciós folyamatokat felderítő módszerek eredményeit alátámasztani, azokat egy időskálán elhelyezni. Az allélikus marker adatok alapján készített legelterjedtebben használt távolság alapú modell az ún. Neighbour Joining (NJ) modell (Saitou & Nei, 1987), mely páronként számított genetikai távolságok alapján épül fel. Mindig a legközelebbi csoportokat (egyedet) vonja össze és ez alapján képezi le a törzsfát. A távolság alapú következtetéssel dolgozó módszerekkel szemben a karakter alapú módszerek (szekvencia) evolúciós modellek felállítására is alkalmasak (Kapli et al., 2020). Ezek közül a következtetési módszerek közül a leggyakrabban alkalmazottak a Maximum Likelihood (ML), ami az adathalmaz alapján a legvalószínűbb modellt ábrázolja, a Maximum Parsimony (MP), ami a legkevesebb karakterváltozással létrehozható fát állítja fel, és a Bayesian inference (Bi), mely egy feltételezett valószínűség és annak ellenkezőjét veti össze. A megfelelő modell kiválasztásához figyelembe kell venni a szekvencia adatokat. Bár az egyes filogenetikai szoftverekkel a Maximum Parsimony alapján generált fa gyorsan elkészül, csak megfelelő hosszúságú, és back, illetve parallel mutációt nem tartalmazó szekvenciákat tud helyesen ábrázolni. Ezzel szemben a Maximum Likelihood és a Bayesian módszer sokkal többféle adatot tud elemezni, azonban jóval időigényesebb, és mindkét módszer esetén ügyelni kell a megfelelő szubsztitúciós modell (1, 2 vagy több paraméteres modell) kiválasztására (Yang & Rannala, 2012). Az ezekkel a módszerekkel dolgozó szoftverek valószínűség számításon alapulnak, és a törzsfák létrehozásakor minden lehetséges fát felállítanak, majd azt fogadják el, melyhez a legkevesebb mutáció feltételezhető. A genetikai változatosság alapján épített filogenetikai hálózatok esetén, ha taxonómiai kapcsolatokat szeretnénk vizsgálni, szem előtt kell tartani annak az esélyét, hogy a két taxon közötti közös őstől származó polimorfítás előbb rögzült, minthogy a két faj elkülönült volna egymástól, de a fa értelmezésekor megtévesztő lehet a többszörös szubsztitúció is.

A populációkat jellemző demográfiai változások számszerűsítésére a Tajima-D és a Fu-féle  $F_s$  értékeit használtuk. A Tajima-D érték a vizsgált populáció egyedeit párokba állítja és a párok differenciáltságát veti össze a szegregáló helyek számával. A negatív érték pozitív szelekcióra utalhat a populációban, esetleg növekvő populáció méretre, míg a negatív értékből, ami azt jelenti, hogy alacsony a kis és nagy frekvenciával rendelkező polimorf bázisok száma, természetes szelekcióra és csökkenő populáció méretre következtethetünk (Tajima, 1989). Míg a Tajima-D a szegregációs helyek számán alapszik, addig a Fu-féle  $F_s$  érték esetében a haplotípusok gyakoriságának eloszlását véve következtethetünk egy lokusz evolúciójára az adott populációban (Fu, 1997).

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1 Mintagyűjtés

A mintavételezés során a vizsgált 3 halfaj (garda, kősüllő, ezüstkárász) minden egyedétől egy nagyjából 1-2 cm<sup>2</sup> nagyságú szövet darab került begyűjtésre a farokúszóból. Kősüllő esetén 118 minta, garda esetén 128 minta, az ezüstkárász esetén pedig 132 minta került felhasználásra. A mintavételek helyét és a halak befogási módját az alábbi 1. számú táblázat ismerteti. Az elektromos halászgéppel mintát vevő kolléga rendelkezett az ehhez a mintázási módszerhez szükséges engedéllyel.

1. táblázat: A dolgozatban vizsgált fajok mintavételi helye, annak módszere, és a mintaszámok területi megoszlása

Faj	Ország	Mintavétel helye	Mintázási módszer	Mintaszám
Kősüllő ( <i>Sander volgensis</i> )	Magyarország	Balaton, Duna, Tisza és a Holt-Körös	Horgászat	Balaton: 72 db
				Duna: 34 db
				Tisza és Holt-Körös: 12 db
				Összesen: 118 db
Garda ( <i>Pelecus cultratus</i> )	Magyarország, Lengyelország	Balaton (Hun), Fertő (Hun), Visztula lagúna(Po)	Angolna csapda (Bal-Hun), Panelháló (Fert-Hun), Visztula-lagúna	Balaton: 54 db
				Fertő: 23 db
				Visztula-lagúna: 48 db
				Összesen: 128 db
Ezüstkárász ( <i>Carassius auratus gibelio</i> )	Magyarország	Balaton (Siófok), Balatoni vízgyűjtők: Kányavár (Kv), Ingó (In), Őszöd- iberek (Öb), Siófok- Töreki (Tö) Hőgyészi tavak	Panelháló (Siófok, Hőgyész) Elektromos halászgép (Kv, In, Öb, Tö)	Balaton (Siófok): 29 db
				Kányavár: 17 db
				Ingó: 18 db
				Őszödi-berek: 19 db
				Siófok-Töreki: 19 db
				Hőgyész: 30 db
				Összesen: 132 db

Az állatokat minden esetben 2-fenoxietanollal altattam a szövetek begyűjtése előtt. A mintavételezés után a szövetdarabok abszolút etanolt tartalmazó 1,5 ml-es centrifugacsövekbe kerültek, majd további felhasználásig -20 C°-on tároltam őket.



### 3.2 DNS izolálás

A DNS izolálás E.Z.N.A szöveti DNS izoláló kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) használatával történt a gyártó protokollja alapján. A DNS töredezettségét először agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A 1,5%-os töménységű agarózt (SeaKem LE Agarose, Lonza), a 0,5 µg/ml interkalálódó etídium bromidot, és a TBE puffert (890 mM Trisz-(hidroximetil)-amino-metán (TRIS), 890 mM Bórsav, 20 mM Etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA)) tartalmazó gélen választottam el a mintánként 5-5 µl DNS-t CleaverScientific típusú kádban. A DNS minőségét géldokumentációs rendszerben, UV fény alatt ellenőriztem a gélen. A DNS koncentrációkat és tisztaságát Implen típusú spektrofotométerrel határoztam meg, és a kapott koncentrációk alapján a tömény DNS-t 50 ng/µl töménységre hígítottam.

### 3.3 Mikroszatellit vizsgálatok

Az 50 ng/µl töménységű DNS-ből a vizsgálni kívánt szakaszt polimeráz láncreakcióval (PCR) szaporítottam fel, azonban a reakció körülmények vizsgált fajokként, markertípusonként és primer páronként is eltérőek voltak. A PCR során használt markertípusokat és primer párokat a 2., a reakció körülményeket pedig a 3. táblázat szemlélteti. A reakciókat minden esetben 25 µl végtérfogatban végeztem el 3-szor 32-es blokkú ProFlex (Applied biosystems, Waltham (USA)), illetve 2 darab 48-as blokkal rendelkező ESCO (Escoglobal, Szingapúr) PCR készülék használatával. A PCR-ek sikerességét a mikroszatellit markerek esetén 2%-os, míg a mitokondriális markerek esetén 1,5 %-os agaróz gélen ellenőriztem. Az agaróz gélelektroforézis során a PCR termékekből 5-5 µl-t futtattam meg, hogy ellenőrizzem nem szaporodott-e fel átermék és megfelelően zajlott-e le a PCR.

2. táblázat: A vizsgálatok során alkalmazott markertípusok és primer párok bemutatása fajonként

Faj	Marker típus	Primer	Primer szekvencia	Ismétlődő régió	Forrás
Kősüllő ( <i>Sander volgensis</i> )	Mikroszatellit	MSL-1	F: TGTTTGTCTCAGCGTCAAGAGG	(CA) <sup>39</sup>	Kohlmann & Kersten 2008
			R: TTCCGCTCCAACATATCACA		
		MS 701	F: CAGAATCACGCAAGCACTC	(AC) <sup>25</sup>	Kánainé et al. 2019
			R: AGTTGTGCGATGGACTAATGT		
		MS 704	F: TGTTCTGGTTTATCTGTTTTGAA	(GT) <sup>22</sup>	
			R: TCTTCGCTGCTTATAGTCTGC		
	MS 404	F: CATTGATGCCTGTAGCAAGTT	(TG) <sup>23</sup>		
		R: CTCAGTAATCTTCCAGGGAGC			
	MS 395	F: GTCTCAGGTCGTTGGCATAG	(AC) <sup>25</sup>		
		R: CATGGGATTACAACCTCTGCTG			
Mitokondriális	D-loop	F: TCACCCCTGGCTCCCAAAGC	-	Liu et al. 2002	
		R: CTAGGACTCATCTTAGCATCTTCAGTG			
Garda ( <i>Pelecus cultratus</i> )	Mitokondriális	D-loop	F: TCACCCCTGGCTCCCAAAGC	-	Liu et al. 2002
			R: CTAGGACTCATCTTAGCATCTTCAGTG		
Ezüstkárász ( <i>Carassius auratus gibelio</i> )	Mitokondriális	D-loop	F: TCACCCCTGGCTCCCAAAGC	-	Liu et al. 2002
			R: CTAGGACTCATCTTAGCATCTTCAGTG		
	Cyt B.	F: GAAGGCGGTCATCATAACTAG	-	Bottero et al. 2003	
		R: GTTTGTCTTCTAACCCGATCAATG			
	Co. I.	F: TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG	-	Ivanova et al. 2007	
		R: CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA			

3. táblázat: A vizsgálatok során alkalmazott PCR körülmények ismertetése fajonként

Faj	Marker típus	Primer	Fluoreszcens jelölés	10X -es (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Puffer	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	dNTP (2,5 mM)	Oligonukleotid primerek (6,6 μM) (F/R)	Taq (5U/μl)	Feltapadási hőmérséklet	Ciklus szám
Kőstüllő ( <i>Sander volgensis</i> )	Mikroszatellit	MSL-1	VIC	2,5 μl	1,5 μl	1,5 μl	0,5 μl	0,2 μl	50 C°	45
		MS 701	PET	2,5 μl	1,5 μl	2 μl	0,5 μl	0,2 μl	55 C°	45
		MS 704	PET	2 μl	2 μl	1,5 μl	0,5 μl	0,2 μl	60 C°	42
		MS 404	PET	2,5 μl	2 μl	2 μl	0,5 μl	0,2 μl	55 C°	45
		MS 395	PET	2,5 μl	1,5 μl	2 μl	0,5 μl	0,2 μl	55 C°	45
	Mitokondriális	Crmt D-loop	-	2,5 μl	2 μl	2 μl	0,5 μl	0,2 μl	52 C°	35
Garda ( <i>Pelecus cultratus</i> )	Mitokondriális	Crmt D-loop	-	2,5 μl	2 μl	1,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	52 C°	35
Ezüstkárász ( <i>Carassius auratus gibelio</i> )	Mitokondriális	Crmt D-loop	-	2,5 μl	2 μl	2 μl	0,5 μl	0,2 μl	52 C°	35
		Cyt B.	-	2,5 μl	2 μl	2 μl	0,5 μl	0,2 μl	52 C°	35
		Co. I.	-	2,5 μl	2 μl	2 μl	0,5 μl	0,2 μl	52 C°	35

### 3.3.1. Mikroszatellit markerek adaptálása

A kősüllő esetén alkalmazott mikroszatellit markerek (Kohlmann & Kersten, 2008; Kánainé et al., 2019a) süllő (*Sander lucioperca*) fajból származtak. A vizsgálatba vont markerek jellemzését a 2. melléklet mutatja be. Az alkalmazott primerek egyike egy 17 bázis hosszú (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') univerzális meghosszabbítást (farkat (tail)) hordozott. Ez komplementer egy harmadik fluoreszcens 5' végen jelölt primerrel. A reakcióhoz hozzáadva a fluoreszcens primer, a farokkal ellátott forwarddal és a reverssel együtt beépül a felsokszorozódott amplikonba (Shuelke, 2000). A kősüllő minták mikroszatellit markeres vizsgálata során minden esetben egy kétlépcsős PCR protokoll került alkalmazásra (4. táblázat). Ilyenkor egy lassú, hosszabb inkubációs idővel rendelkező előciklus során egy kezdeti termék-felzaporítás történik. Az előző ciklusoknak köszönhetően a második lépcső során már rövidebb inkubációs időket alkalmaztam a gyorsabb amplifikáció érdekében. Az eredeti, süllő esetén alkalmazott protokollok is kétciklusos előamplifikációval indultak (Kánainé et al., 2019a). Vizsgálataimban a preamplifikációs szakaszban az ismétlések száma mindegyik marker (MSL-1, MS 701, MS 704, MS 404, MS 395) esetén 2 ciklus volt. A második lépcsőben a ciklusszám az MSL-1 marker esetén 25, az MS 701, MS 704, MS 404, MS 395 esetén pedig 45 ciklus volt. A kiindulási süllő protokoll az MSL-1 esetén egy TouchDown PCR volt. Ebben az első ciklus sorozat 10 ismétlésből állt, és a feltapadási hőmérséklet 60 °C-ról csökkent fokozatosan 50 °C-ra, ciklusonként 1 °C-t hűlve (Kohlmann & Kersten, 2008).

4. táblázat: A süllő és kősüllő markerek kétlépcsős PCR hőprofilja. A feltapadási hőmérsékletek változásait az egyes markerek esetén a 2. táblázat szemlélteti

	2 min 95 °C	1x
Ciklus (1. lépcső)	15 sec 95 °C	2x
	1 min 55°C	
	2 min 72 °C	
Ciklus (2. lépcső)	15 sec 95 °C	45x
	20 sec 55 °C	
	40 sec 72 °C	
Elongáció	5 min 72 °C	1x
	4 °C	Végtelen

### 3.3.2. Kapilláris gélelektroforézis

A mikroszatellit elemzés következő lépéséhez, a kapilláris gélelektroforézishez, a PCR termékeket nem szükséges tisztítani, de a mintákat elő kell készíteni a futtatáshoz. A minta-előkészítés során a PCR termékekhez hozzámértem a 0,1 µl molekulásúly markert (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystem, USA), és a 9,9 µl Hi-Di formamidot (Applied Biosystem, USA). A kapilláris gélelektroforézishez szükséges reakció elegyet minden esetben 10 µl végtérfogatban mértem össze, azonban a PCR templát mennyisége az agaróz gélelektroforézissel ellenőrzött termék erősségétől függött. A „gyengébb” termékekből 0,3 µl-t, míg a gélen nagyobb koncentrációt mutató mintákból 0,5 µl-t mértünk hozzá a reakcióhoz. A kihígított terméket a kapilláris gélelektroforézis előtt 94 °C-on 6 percig denaturáltam ProFlex PCR készülékben (Applied Biosystems, USA). A kapilláris gélelektroforézist

NanoPOP7 (Applied Biosystem, USA) polimer használatával, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetében található 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA) készülékén végeztem el 50 cm hosszú kapillárison keresztül.

### 3.4. Mitokondriális DNS vizsgálatok

#### 3.4.1. A mitokondriális PCR-ek

A mitokondriális genom vizsgálata során mindhárom faj (kősüllő, ezüstkárász, garda) és mindhárom alkalmazott mitokondriális marker (D-loop, Citokróm *b*, Citokróm oxidáz 1) esetén azonos, 25 µl végtérfogatú reakció elegyet használtam, aminek összetevői a 3. táblázatban, hőprofilja mely szintén megegyezett mindegyik marker esetén a 5. táblázatban került feltüntetésre.

5. táblázat: Az ezüstkárász, garda és kősüllő vizsgálata során alkalmazott hőprofil a mitokondriális genom kontroll régiója (D-loop), a Citokróm oxidáz 1 és a Citokróm *b* markerek esetén.

	2 min 95 °C	1x
Ciklus	30 sec 95 °C	35x
	30 sec 52 °C	
	1 min 72 °C	
Elongáció	10 min 72 °C	1x
	4 °C	végtelen

A mitokondriális marker vizsgálatok esetén a sikeres amplifikálást követően a PCR termékeket meg kell tisztítani a reakció során esetlegesen fennmaradó összetevőktől, mint például a be nem épült oligonukleotidok, mert a szekvenálási reakció érzékeny a termék tisztaságára. A PCR tisztítást a Sigma Aldrich gyártó (Merck, Darmstadt, Németország) GenElute PCR tisztító kitjével végeztem el, a gyártó protokollja alapján. A tisztított PCR termék centrifugacsövekbe került, melyeket a további felhasználásig -20 C°-on tároltuk.

#### 3.4.2. A mitokondriális szekvenálás

A szekvencia leolvasáshoz a főlegesen reakció összetevőktől megtisztított PCR termékeket három lépésben készítettem elő. Első lépésként a mintákat ismét megfuttattam 1,5 %-os agaróz gélen, hogy ellenőrizzem a tisztítási lépések sikerességét és a termékek erősségét. Második lépésként a tisztított PCR terméken egy szekvenáló PCR-t végeztem BigDye Terminator V3.1 szekvenáló kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével. A szekvenáló reakció 10 µl végtérfogatban került összemérésre. A protokollt a reakció összetevőkkel és az alkalmazott hőprofil a 6. táblázat szemlélteti. A vizsgált mitokondriális genom régiók (D-loop, Citokróm *b*, Citokróm oxidáz 1) nagy mérete miatt a szekvenáló reakciókat mindhárom faj minden mintája esetén reverz és forward irányból is elvégeztem.

6. táblázat: Szekvenáló PCR protokoll a kőszülő, ezüstkárász és garda mitokondriális vizsgálatokhoz

Szekvenáló reakció összetétel		Szekvenáló PCR - Hőprofil		
Bid Dye	2 µl	96 °C	10"	28x
Big Dye puffer	2,5 µl	50 °C	5"	
Primer (6,6 µM)	2 µl	60 °C	4'	
tisztított PCR templát	3,5 µl	4°C	Végtelen	
Összesen	10 µl			

A szekvenáló PCR után harmadik lépésként etanolos-precipitációt végeztem, hogy a mintát a PCR során be nem épült oligonukleotidoktól is megtisztítsam, és kellő minőségű legyen a bázissorrend meghatározáshoz. A precipitáció első lépéseként mintánként 80 µl etanolt és Na-acetátot tartalmazó elegyet mértem a (gélelektroforézis után maradt) 20 µl térfogatú szekvenáló reakciókhoz. A precipitációs keverék pontos összetétele: 3 µl Nátrium-acetát (3M), 14,5 µl MQ tisztaságú víz, 62,5 µl cc. etanol. A precipitációs eleggyel alaposan elkevertem a mintákat majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltam. Az inkubáció után 4 °C-on, 20 percig 4600 RPM-en centrifugáltam (Hettich Rotanta 460 centrifuga). A centrifugálás után a mintákról eltávolítottam a felső fázist, majd 180 µl 70%-os etanolt adtam hozzájuk. Ezt követően ismételtén 4 °C-on 20 percig 4600 RPM-en centrifugáltam őket, majd a felső fázist eltávolítottam. A mintákat ezt követően kiszárítottam, eltávolítva ezzel a maradék alkoholt is, majd mintánként 20 µl HiDi formamidban feloldottam őket és minimum egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltam. Az inkubációt követően a szekvenáló gépbe helyezés előtt 94 °C-on 6 percig denaturáltam. A bázispár meghatározás az első minták esetén, a 2019 előtt a kapilláris gélelektroforézisekhez is alkalmazott 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) készüléken négy 50 cm-es kapillárisal, majd egy újabb típusú 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) készüléken zajlott nyolc 50 cm-es kapillárison keresztül.

### 3.5 Az adatok elemzése populációgenetikai szoftverekkel

#### 3.5.1. Mikroszatellit markerek szoftveres elemzése

A mikroszatellit markerek esetén a Genetic Analyzer készülék által leolvasott nyers adatokat a GENEMAPPER SOFTWARE VER. 4.0 (Applied Biosystem) segítségével jelenítettem meg, majd a kapott görbéket értékelve az allélméreteket EXCEL (Microsoft) táblázatban rögzítettem. A kiértékelés következő lépéséhez az allélméreteket tartalmazó munkalaphoz bővítményként hozzáadtam a GENALEX VER.6.5 (Peakall & Smouse, 2012) szoftvert. Ez utóbbival egyfelől létrehoztam a GENEPOP VER 4.7 (Rousset, 2008) szoftver bemeneti file-ját, másfelől kiszámítottam a markereket jellemző polimorfizmus információs tartalom értékeit (PIC érték), a várt és valós heterozigotitási értékeket (He, Ho), az F-statisztika értékeit,

a Nei-féle genetikai távolságokat, és a program által létrehozott egyedek, illetve populációk közötti távolságmátrix alapján PCoA (Principal Coordinate Analysis) elemzést készítettem. A GENEPOP szoftver segítségével kiszámoltam a populációkat jellemző Hardy-Weinberg-féle genotípus gyakorisági értékeket és az eltérés szignifikancia szintjeit (Hardy, 1908; Weinberg, 1908), valamint a populációkat jellemző privát allélokot. A populációk szerkezetét jellemző klaszterek számát a DeltaK érték alapján a STRUCTURE VER 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) szoftverrel határoztam meg, 2-12 klaszterrel (K), korrelált allél frekvenciával,  $10^5$  burnin és  $10^5$  MCMC generációt alkalmazva. Az eredményeket az online elérhető (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) STRUCTURE Harvester program segítségével értékeltem (Earl & vonHoldt, 2012). A legvaglószerűbb klaszter számot a program az Evanno-módszer segítségével határozta meg (Evanno et al., 2005). A főkomponensekre végzett diszkriminancia analízist (DAPC) az R 4.1.0 szoftver „adagenet” programcsomagjával készítettem el (Jombart, 2008).

### 3.5.2. Mitokondriális markerek szoftveres elemzése

A mitokondriális markerek esetén a nyers szekvencia adatokat a MEGA X szoftverbe (Kumar et al., 2018) importáltam. A programban a kromatogramok alapján a szekvenciákat trimmeltem, és mintánként reverz és forward irányból illesztettem, majd a konszenzusokat a Mega szoftverben a CLUSTALW (Higgins & Sharp, 1988) algoritmussal illesztettem össze a többi egyed szekvenciáival. Az Alignmentet (az illesztett szekvenciákat) ezt követően FASTA formátumban mentettem ki a szoftverből, és a DNASP6 (Rozas & Rozas, 1995) szoftverbe importáltam. A programmal kiszámoltam az egyes populációkat jellemző haplotípus és nukleotid diverzitási értéket ( $\pi$ ), a filogenetikai szempontból informatív pozíciók számát (parsimony informative sites), meghatároztam a polimorf bázisok helyét a szekvencián, és a populációkat jellemző haplotípusokat. Kiszámítottam a populációkat jellemző Fu-féle  $F_s$  értéket, és a Tajima-féle genetikai távolságot (D). Az azonosított haplotípusokat az NCBI (National Center for Biotechnology Information), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programjával ellenőriztem (Altschul et al., 1990). A haplotípusok illesztését, akár csak a korábbi szekvenciák esetén is, a Mega X szoftverrel végeztem el, és az így illesztett formátumból hoztam létre a szoftveren keresztül a populációkat jellemző filogenetikai törzsfákat. Mindhárom faj (kősüllő, ezüstkárász, garda) és az ezüstkárász vizsgálatokor mindhárom mitokondriális DNS marker (D-loop, Citokróm *b*, Citokróm oxidáz 1 alegység) esetén a filogenetikai törzsfákat a Tamura-Nei féle genetikai távolság alapján, 1000-es bootstrap értéket megadva, Maximum Likelihood alapján készítettem el. A haplotípusok közötti rokonsági kapcsolatokat bemutató hálózati ábrát a PopART szoftverrel (Bandelt et al., 1999; Clement et al., 2002) median-joining hálóval készítettem el. A Citokróm oxidáz 1 alegység vizsgálatokor az ezüstkárász esetén a kapott haplotípusokat a BLAST elemzés mellett a BOLD (Barcode of Life Data) VER. 4 szoftverrel is ellenőriztem (Ratnashingham & Hebert, 2007).

## 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 4.1. A kősüllő

A kősüllőn végzett vizsgálataim során 118 egyed genetikai diverzitását vizsgáltam, 5 mikroszatellit markerrel (MSL-1, MS 701, MS 704, MS 404, MS 395) és a mitokondriális genom kontroll régiója (D-loop) alapján. A süllő protokollok optimalizálását követően sikeresen elvégeztem a vizsgálni kívánt szekvenciák felsokszorozását PCR-rel. A vízterületeken egymáshoz közel eső állásokon horgászattal kifogott egyedeket nem kezeltem külön populációként, így a nagyobb vízterületi egységet tekintettem egy populációnak, azaz a Duna (Du), a Balaton (Bal) és a Tisza\_Holt-Körös (T\_HK). A begyűjtött egyedszámok az egyes területeken élő kősüllő populációk méretével és fogási nehézségeivel függenek össze. A könnyebb átláthatóság érdekében a kapott eredményeket külön ismertetem a mikroszatellitek és a mitokondriális marker esetén, az előbbivel kezdve.

#### 4.1.1. A kősüllőn végzett mikroszatellit marker vizsgálatok

##### 4.1.1.1 A mikroszatellit markerek optimalizálása

A PCR optimalizálás során elsősorban a  $MgCl_2$  mennyiségét, a feltapadási hőmérsékleteket és a ciklusszámokat változtattam meg, hogy megteremtsem az ideális reakció körülményeket. A szakirodalomban használt adatokat, és a vizsgálat során a kősüllőn működő protokollok közötti különbséget a 7. táblázat szemlélteti, az optimalizálás során nem változtatott mennyiségeket pedig az anyagok és módszerekben korábban bemutatott 3. táblázatban tüntettem fel.

7. táblázat: Süllőből izolált mikroszatellit markerek kiindulási protokolljában és a kősüllőn történő alkalmazásuk során működő hőprofilok és anyag mennyiségek összevetése.

	Süllő ( <i>Sander lucioperca</i> )			Kősüllő ( <i>Sander volgensis</i> )		
	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Feltapadási hőmérséklet (2.Ciklus sorozat)	Ciklus szám (2.Ciklus sorozat)	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	Feltapadási hőmérséklet (2. Ciklus sorozat)	Ciklus szám (2. ciklus sorozat)
MSL-1	2 µl	50 °C	25	1,5 µl	50 °C	45
MS 701	2 µl	55 °C	45	1,5 µl	55 °C	45
MS 704	2 µl	55 °C	45	2 µl	60 °C	42
MS 404	2 µl	55 °C	45	2 µl	55 °C	45
MS 395	2 µl	55 °C	45	1,5 µl	55 °C	45

Két, a süllő vizsgálatok során működő mikroszatellit marker esetén (MS 423, MS 424) a protokoll többszöri változtatásával sem sikerült terméket felszaporítani. Hat



marker (MS 420, MS 417, MS 192, MS 384, MS 373, MS 703) pedig a kapilláris gélelektroforézis alapján monomorfnak bizonyult, vagy minden egyedben ugyanazt az allél mintázatot kaptam, maximum kétféle allélmérettel rendelkezett, mely alapján nem alkalmasak a további genetikai vizsgálatokra a vizsgált kőszülő populációk esetében. Az MS 420-as marker esetében ezek 161 és 171-es allél méretek, az MS 417-nél 266, az MS 192-nél 223, az MS 384-nél 266, az MS 373 esetében 180 és 190, az MS 703 markernél pedig kizárólag 170 bp hosszúságú allélokot detektáltam. Az adaptált mikroszatellitek esetében gyakori, hogy a recipiens fajban nem amplifikálódnak, monomorfak vagy más nem homológ szekvenciát sokszoroznak fel (Yue et al., 2010). Az összes egyed és marker esetében kapott allélméreteket a 3. melléklet mutatja be. A vizsgált populációkban az egyes lókuszek esetén kapott allélok méreteit és allélfrekvenciájukat összesítve a 8. táblázat ismerteti.

#### 4.1.1.2 A mikroszatellit markerekkel végzett populáció vizsgálatok

A protokollok optimalizálása után végül a Kánainé-féle süllő markerek (Kánainé et al., 2019a) közül 4 markerrel (MS 701, MS 704, MS 404, MS 395), illetve a mellé választott, a szakirodalomból szintén süllőre leírt, és áttemelt MSL-1 (Kohlmann & Kersten, 2008) markerrel 3 populáción végeztem el a mikrosatellit elemzést, bizonyítva a markerek fajok közötti adaptálhatóságát.

8. táblázat: A teljes vizsgálati állományban az egyes lókuszek esetén kapott allélok és azok frekvenciája, ahol A(s) az allélok mérete (bp), A(f) pedig a hozzájuk tartozó allélfrekvencia, kiemelve a leggyakrabban előforduló allél méreteket.

Markerek elnevezése	MS 701		MS 704		MS 404		MSL-1		MS 395	
	A(s)	A(f)%	A(s)	A(f)%	A(s)%	A(f)%	A(s)	A(f)%	A(s)	A(f)%
A(s): Allél méret (bázis)	286	1,27	266	2,56	368	26,50	231	13,60	241	4,35
A(f): Allél frekvencia	292	1,27	268	0,85	398	13,68	233	1,32	245	17,83
	298	47,46	270	12,39	406	0,85	235	10,53	249	21,30
	302	6,78	272	1,71	408	30,34	237	12,28	251	41,30
	304	25,42	274	1,28	410	14,96	239	35,09	254	0,87
	308	14,41	276	1,28	412	2,56	241	3,95	255	6,52
	312	3,39	278	4,27	414	2,56	243	14,91	259	2,17
			280	19,66	416	1,28	245	8,33	263	0,43
			282	52,56	418	4,70			267	0,87
			286	2,14	420	2,56			269	3,91
			290	1,28					271	0,43

A kőszülő populációk vizsgálata során a legtöbb allélt az MS 704-es és az MS 395-ös markerrel tudtam kimutatni. Mindkét esetben a populációkat együttesen nézve 11 darab allélt kaptam. Ezeket követte a sorban az MS 404-es marker 10 darab alléllal, majd MSL-1 8 db és az MS 701 7 db alléllal. A markerenként legnagyobb frekvenciával rendelkező allélméreteket 3 esetben is (MS 701, MS 704, MS 395) meghaladják, vagy megközelítik az 50 %-ot, ami azt jelenti, hogy az összes egyed vizsgált lókuszeinek majdnem fele az adott allélmérettel rendelkezik. Egy mikrosatellit marker alkalmazhatóságának vizsgálatakor az ilyen magas allél frekvencia nem feltétlenül jelent jót. Ha több allélméret van, és változatosabb a megoszlásuk, a marker polimorfítása is magasabb, és alkalmasabbá válnak az egyedek

és populációk differenciáltságának mérésére. Az általam alkalmazott markerek mindegyike a rendkívül informatív kategóriába esett, ha a populációkat összességében nézzük. Az MS 701-es PIC értéke, akár csak az MS 704-esé 0,63. Az MS 404-esé 0,76, az MS 395-ösé 0,71, az MSL-1-esé pedig 0,77. Érdekes azonban populációnként külön-külön is megnézni ezeket az értékeket (9. táblázat), mert előfordulhat, hogy egyes populációk esetében a differenciáltság olyan mértékű eltolódást mutat, hogy míg az egyik populáció esetében az adott marker kellően informatív, a másik populációban már nem.

9. táblázat: A kősüllő esetén alkalmazott 5 mikroszatellit marker (MS 701, MS704, MS404, MSL-1, MS 395) polimorf információs tartalma (PIC) a vizsgált 3 populációban (Balaton (Bal), Duna (Du), Tisza\_Holt-Körös (T\_HK)), szürkével kiemelve a mérsékelt informatív markereket.

	Bal	T_HK	Du
MS 701	0,44	0,56	0,67
MS 704	0,64	0,26	0,61
MS 404	0,72	0,24	0,41
MS 395	0,75	0,68	0,5
MSL-1	0,79	0,55	0,48

Ha a populációkra külön bontva nézzük meg az eredményeket az egyes markerek PIC értéke több esetben is a mérsékelt informatív kategóriába esik. Mindhárom populáció esetében volt olyan marker, ami az adott populációban csak mérsékelt informatív bizonyult. Az MS 404 mikroszatellit marker egyedül a balatoni kősüllő populáció (Bal) esetében bizonyult rendkívül informatív. A Tisza és Holt-Körös együttes populációja (T\_HK) esetén mutatták a legrosszabb használati értékeket a markerek, de itt figyelembe kell venni az alacsony mintaszámot is. Az MS 704 és MS 404-es marker is épp, hogy csak bekerültek a mérsékelt informatív kategóriába, és még a maradék 3 közül (MS 701, MSL-1, MS 395) is kettő éppen csak átlépte a 0,5-ös határértéket. Ez adódhat a vizsgált populáció mintaszámából is. Ezt a feltételezést támasztja alá a magasabb mintaszámmal (N=72) rendelkező balatoni populáció (Bal) esetében kapott eredmény, ahol még a legalacsonyabb PIC értékű MS 701-es marker is csak 0,1-el alacsonyabb értékkel tért el a „rendkívül informatív” kategóriától. A balatoni populáció esetén az MSL-1-es marker 0,79-es PIC értékkel a leginformatívabb a kategóriában, míg ugyanez a marker a dunai (Du) esetén a második legkevésbé informatív markernek bizonyult, pedig a mintaszámok tekintetében a 32 már nem tekinthető annyira alacsonynak, hogy ilyen szinten befolyásolja az eredményeket. Ebben az esetben a mintaszámok mellett a kapott allélméreték eloszlása, azaz a heterozigóta és homozigóta egyedek aránya befolyásolja az értékek alakulását, ami a heterozigotizációs értékeknél is megfigyelhető. A vizsgált kősüllők esetében az összes egyedre nézve markerenkénti bontásban elmondható, hogy egyik marker esetén sem tapasztaltam szignifikáns eltérést a Hardy-Weinberg egyensúlytól.

Bár összesítve egyik marker esetén sem volt szignifikáns az eltérés, ebből nem lehet következtetni az egyes populációk külön-külön eltérésére az ideális egyensúlyi állapottól. Esetemben külön-külön vizsgálva a 3 kősüllő populációt több esetben is nagymértékű eltérést tapasztaltam az ideális állapottól. Pusztán az alacsony mintaszámú Tisza\_Holt-Körös populáció esetében fordult elő nem szignifikáns eltérés

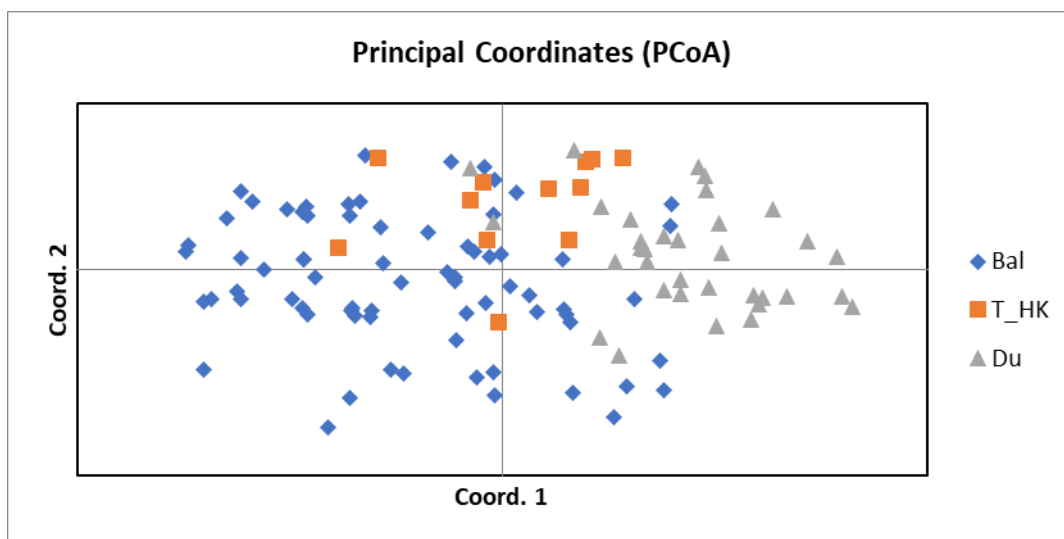
a 701-es és a 395-ös markere esetén (10. táblázat). Megállapítható tehát, hogy mind a Balatonban, mind a Dunában heterozigóta hiány figyelhető meg.

10. táblázat: A vizsgált kősüllő populációkra (Balaton- Bal, Tisza\_Holt-Körös (T\_HK, Duna-Du) kapott várt ( $H_e$ ) és megfigyelt ( $H_o$ ) heterozigotizációs értékek, az allélgazdagság markerenként ( $A_r$ ) valamint a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés szignifikanciája markerenként, ahol \*  $P < 0,05$ .

	MS 701				MS 704				MS 404				MSL-1				MS 395			
	He	Ho	F <sub>is</sub>	A <sub>r</sub>	He	Ho	F <sub>is</sub>	A <sub>r</sub>	He	Ho	F <sub>is</sub>	A <sub>r</sub>	He	Ho	F <sub>is</sub>	A <sub>r</sub>	He	Ho	F <sub>is</sub>	A <sub>r</sub>
Bal	0,5	0,33	0,47	6	0,67	0,44	0,02	11	0,75	0,47	0,27	9	0,83	0,31	0,66	8	0,79	0,45	0,36	10
Bal p.	***				***				***				***				***			
T_HK	0,7	0,58	-0,15	4	0,3	0,16	0,32	5	0,29	0	1	2	0,63	0,09	-0	4	0,75	0,91	-0,3	5
T_HK p.	ns.				ns.				***				***				ns.			
Du	0,7	0,17	0,45	5	0,68	0,57	0,13	3	0,52	0,78	-0,67	3	0,55	0,34	0,25	4	0,55	0,35	-0,1	5
Du p.	***				*				***				*				***			

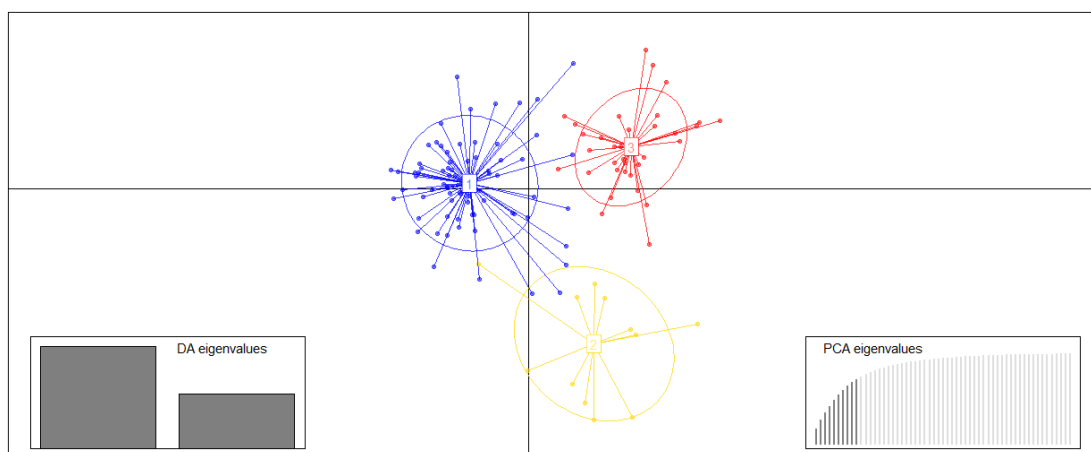
Hogy a genetikai egyensúlyi állapotok mellett még több adatot szerezzek az adott populációkról, a vizsgált markerekkel kiszámítottam a Fixációs index mutatóit is. Az  $F_{is}$  érték, mely a populációkon belüli differenciáltságot méri a Balaton esetén összesítve 0,403, a Tisza\_Holt-Körös csoport esetén 0,351, a dunai kősüllő minták esetén pedig 0,447 volt. Az adatok alapján a három kősüllő populáció közül a Tisza\_Holt-Körös tűnt a legváltozatosabbnak az egyedek szintjén. A koefficiens mindhárom populáció esetén pozitív értéket vett fel, ami alátámasztja a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés szignifikancia tesztjén kapott eredményeket és a heterozigóta hiányt. A populációk közötti együttható  $F_{st}$  értéke a balatoni és a Tisza\_Holt-Körös mintái között 0,1688, a balatoni és dunai között 0,058, míg a Tisza\_Holt-Körös és Duna között 0,0731. Elmondható tehát, hogy a populációk közötti differencia a Balaton és a Tisza\_Holt-Körös között közepes, a többi összehasonlításban pedig alacsony szintű. A távolságok arányosan változnak a valós földrajzi távolságokkal. A balatoni populáció bár nagyobb hasonlóságot mutat a dunaival, mint a két folyóvíz egymással, az allélok szintjén meglehetősen egyedi. Az 5 lókusza együttesen nézve 20 privát allélt hordoz, szemben a dunai és a Tisza\_Holt-Körös populációkkal, melyek 1-1-et.

Az egyedek közötti genetikai távolság alapján PCoA (Principal Coordinate Analysis vagy főkoordináta analízis) elemzést is végeztünk (8. ábra).



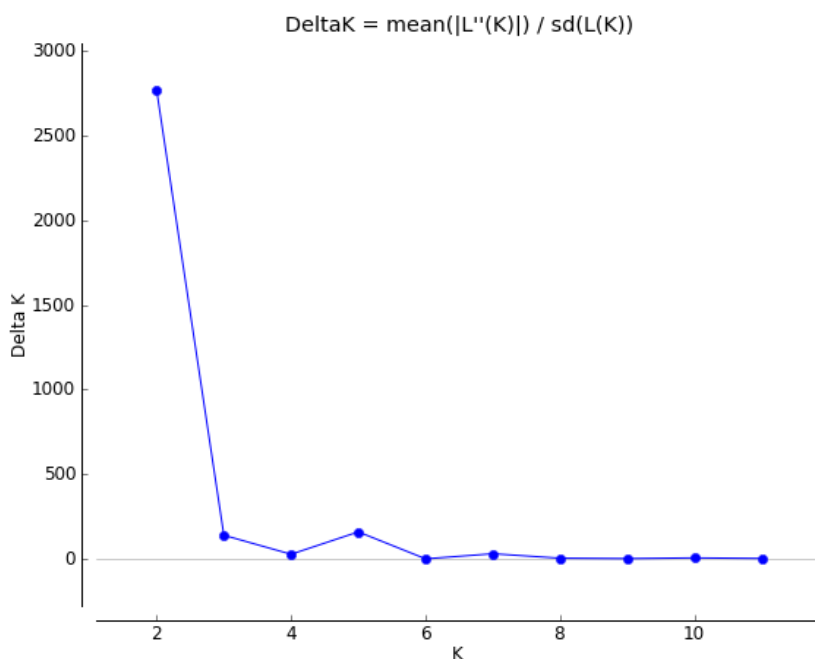
8. ábra: Kősüllő populációk főkoordináta elemzése, ahol Bal=Balaton, T\_HK=Tisza\_Holt-Körös, Du=dunai populáció

A genetikai távolság alapján készített ábra jól szemlélteti a populációk egyedeinek differenciáltsági viszonyát, azonban a populációk közötti eltéréseket nem tükrözi. Érdekes, hogy bár a heterozigotitási adatok alapján a balatoni (Bal) populáció nagyobb hasonlóságot mutat a dunaival (Du), mégis a két populáció egyedei a PCoA elemzés során sokkal inkább eltávolodnak egymástól, mint a Tisza\_Holt-Körös populáció, mely a genetikai távolságok alapján viszonylag egységes átfedést mutat a másik kettővel. Ezt a többi koordináta variáció is alátámasztotta (7. melléklet). Egyetlen koordináta elrendezésben keveredtek látványosan a populációk egyedei, de ezt az elrendezést sem a többi koordináta elrendezés során generált PCoA ábra, sem az 'R' statisztikai szoftverrel készített DAPC analízis (9. ábra), sem pedig a Structure program klaszterezése során kapott DeltaK érték nem támasztotta alá (10. ábra).

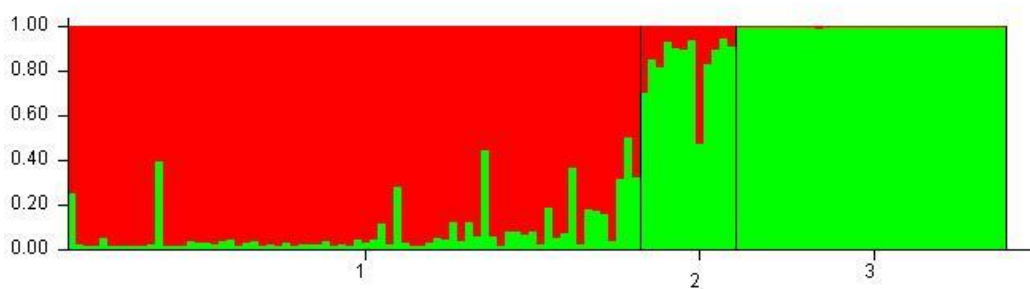


9. ábra: Kősüllő populációk klaszter elemzése az R statisztikai szoftverrel, ahol 1: balatoni populáció (Bal), 2: Tisza\_Holt-Körös populáció (T\_HK), 3: dunai populáció (Du).

A Structure elemzés a 3 mintavételi hely (Balaton, Tisza és Holt-Körös együttes, Duna) esetén 2 klaszter elkülönülését tartotta a legvalószínűbbnek 12 futásból az Evanno módszer alapján (Evanno et al., 2005). A 3 populáció egyedeinek alléleloszlását a 2 klaszterben a 11. ábra szemlélteti.



10. ábra: A Structure szoftverrel meghatározott és Structure Harvester programmal megjelenített delta K érték, ahol a 12 futás (K) alapján a 3 kősüllő populáció egyedei 2 klaszterbe sorolódnak.



11. ábra: Kősüllő egyedek megoszlása a három populációban, ahol 1 a balatoni, 2 a Tisza\_Holt Körös, 3 pedig a dunai populáció, pirossal és zölddel pedig a két klaszter 12 K, azaz futás szám alapján.

Ha a mikroszatellit elemzést nézzük, összességében elmondható tehát, hogy a közeli rokon fajok esetén valóban sokszor, de nem minden esetben működik a mikroszatellit marker adaptáció, és előfordul, hogy az egyik faj esetén polimorfnek mutatózó marker a másik fajnál már egyértelműen monomorf. A 13, kezdetben kijelölt mikroszatellit marker közül 11 esetében sikerült a protokoll optimalizálásával terméket felszaporítani, azonban az allélméretetek detektálásával csak 5 bizonyult

kellően polimorfnak a genetikai diverzitásvizsgálatokhoz. A PIC értékek alátámasztották, hogy ez az 5 marker jól alkalmazható a populációgenetikai vizsgálatokra. Mindhárom populáció (Tisza\_Holt-Körös, Duna, Balaton), melyeken a gyakorlatban is teszteltem ezeket a markereket, mérsékelt heterozigóta hiányt mutatott a Hardy-Weinberg teszt alapján. A dunai hordozta a legtöbb heterozigóta egyedet az összes markerre nézve. A balatoni populáció bár nagyobb mintaszámmal, alacsonyabb heterozigotizást mutatott, de szintén értékes genetikai állománnyal rendelkezik, mivel nagy mennyiségű, csak a balatoni populációra jellemző privát allélt hordoz (4. és 5. mellékletek). A Tisza\_Holt-Körös populáció vizsgálatába pedig a jövőben mindenképp érdemes lesz több egyed is bevonni, mivel az alacsonyabb mintaszám ellenére is változatosnak bizonyult az állomány, de az eredményeket érdemes a mitokondriális vizsgálatokkal is összevetni.

#### 4.1.2 A kőszüllőn végzett mitokondriális marker vizsgálatok

A három kőszüllő populáció (Bal, T\_HK, Du) mitokondriális genomjának vizsgálatakor az ún. kontroll régiót, azaz D-loop régiót vizsgáltam. Hat minta esetén a mikroszatellit tesztekhez használt DNS és a kiindulási szövet is elfogyott, így azok nem kerültek be a mitokondriális elemzésbe. Az elemzést végül 68 balatoni, 10 Tisza\_Holt-Körös egységi és 34 dunai mintán végeztem el. A PCR-ek mindegyik mintán sikeresnek bizonyultak. A szekvenálás utáni illesztést követően mintánként 849 bázispár hosszúságú szekvencia állt rendelkezésemre a vizsgálatokhoz. A vizsgált 849 bázisból 8 bázis volt polimorf, és mind a 8 a parszimónia számára informatív helynek bizonyult. A 8 polimorf bázis (12. ábra) 7 haplotípust határozott meg (12. táblázat). A 8 polimorf bázis közül az első a 74-es, a második a 75-ös, a harmadik a 83-as, a negyedik a 100-as, az ötödik a 104-es, a hatodik a 105-ös, a hetedik a 154-es és a nyolcadik a 174-es nukleotid pozícióban található.

```

MATRIX
[
[
Hap_1  TAAAATGA
Hap_2  .....A.
Hap_3  ..G.....
Hap_4  ..GT....
Hap_5  ....TAA.
Hap_6  ....TA..
Hap_7  ATGT...C
;
END;

```

12. ábra: Kőszüllő haplotípus számok, és az őket meghatározó polimorf bázishelyek a balatoni, dunai és tiszaholt-körösi csoport mintái esetén a leggyakoribb 1-es haplotípushoz viszonyítva (Hap\_1).

A haplotípus diverzitás értéke a 3 populációra együttesen nézve ( $H_d$ ): 0,6049, míg a nukleotid diverzitás értéke ( $\pi$ ): 0,001. Ha külön-külön nézzük az egyes populációkat (10. táblázat) a balatoni populáció nukleotid diverzitási mutatói hasonló értéket vettek fel a három populáció együttes értékeivel, azonban ebből messzemenő következtetést nem célszerű levonni tekintve, hogy a balatoni populációból rendelkezünk a legnagyobb mintaszámmal is. Ez a populáció hordozta a legtöbb, összesen 7 haplotípust. Ezt követte a dunai 3 és a tisza-holt-körösi egység 2 haplotípussal. Bár a haplotípusok számában és ebből fakadó diverzitás értékében a Tisza\_Holt-Körös csoport hasonlónak mutatkozott a dunaihoz. Ha azonban figyelembe vesszük a  $F_u$ -féle  $F_s$  értéket, és a Tajima-féle differenciáltságot, látszik, hogy a Tisza\_Holt-Körös populáció jelentős eltérést mutat a másik kettőtől. Ez a populáció kapott egyedülként pozitív szignifikáns értéket a Tajima-féle D-teszten. Ez visszavezethető egy hirtelen egyedszám csökkenésre a közelmúltban, de figyelembe kell venni az alacsony mintázott egyedszámot is.

10. táblázat: A haplotípus (gén) diverzitás és a nukleotid diverzitás bázishelyenként a vizsgált kősüllő populációk esetében, ahol H: a hordozott haplotípusok száma,  $H_d$  a haplotípus diverzitás,  $\pi$  a nukleotid diverzitás, SSD a diverzitás mutatók standard deviancia értéke,  $F_s$  a  $F_u$ -féle  $F_s$ , D pedig a Tajima féle differenciáltság,  $p(D^*)$  pedig a hozzátartozó szignifikancia szint.

Populáció	H	$H_d$	SSD ( $H_d$ ) $\pm$	$\pi$	SSD ( $\pi$ ) $\pm$	$F_s$	D	p ( $D^*$ )
Bal	7	0,65	0,04	0,001	0,0002	-0,89	-0,67	ns
T_HK	2	0,53	0,09	0,0006	0,001	1,09	1,3	*
Du	3	0,43	0,09	0,005	0,0001	0	-0,09	ns

A Tamura-Nei féle genetikai távolság alapján a legnagyobb genetikai távolság a Tisza\_Holt-Körös és a balatoni populáció között figyelhető meg (11. táblázat). A Balaton esetén megfigyelt negatív  $F_u$ -féle  $F_s$  növekvő populáció méretre utal, ezt támasztja alá, a Tajima féle -0,67-es D érték is. Országos szinten a FAO statisztika is hasonló adatokat mutat, ahol a mintázási időszakban (2016 és 2017) az országos fogás 11 t-élő súlyról 13 tonnára emelkedett. Bár ez biztató eredmény, a mennyiség még mindig csekély a 2015-ös évben rögzített 18 tonnás adathoz képest (FAO, 2019).

11. táblázat: Kősüllő populációk közötti genetikai távolság (Tamura-Nei modell), a Mega szoftver által kalkulálva, 1000-es bootstrap értékkel.

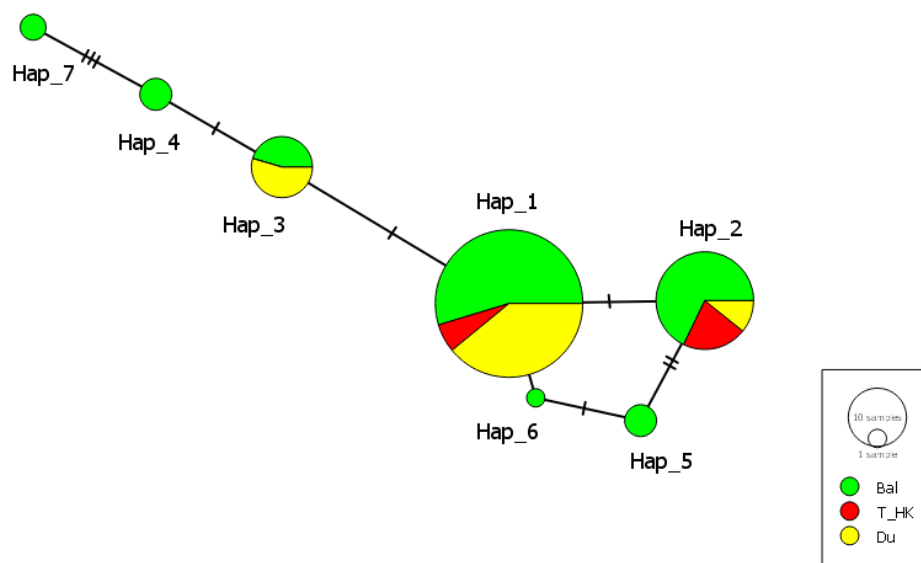
	T_HK	Du	Bal
T_HK			
Du	0,000897		
Bal	0,001137	0,00107	

12. táblázat: Kősüllő egyedek haplotípus megoszlása a mitokondriális DNS D-loop régió szekvenciája alapján (Bal-Balaton, T\_HK-Tisza, Holt-Körös, Du-Duna).

Hap_1 (n:64)	THK_6, THK_3, THK_2, THK_1, Du_34, Du_33, Du_31, Du_30, Du_29, Du_28, Du_27, Du_26, Du_24, Du_23, Du_22, Du_21, Du_20, Du_19, Du_18, Du_17, Du_16, Du_12, Du_11, Du_10, Du_9, Du_8, Du_7, Du_2, Du_1, Bal_1, Bal_69, Bal_67, Bal_66, Bal_64, Bal_63, Bal_62, Bal_60, Bal_58, Bal_57, Bal_53, Bal_52, Bal_51, Bal_48, Bal_46, Bal_37, Bal_35, Bal_34, Bal_31, Bal_30, Bal_28, Bal_24, Bal_22, Bal_19, Bal_17, Bal_16, Bal_15, Bal_14, Bal_12, Bal_10, Bal_9, Bal_6, Bal_3, Bal_2, Bal_1
Hap_2 (n:28)	THK_4, THK_11, THK_10, THK_8, Du_6, Du_5, Du_4, Bal_70, Bal_65, Bal_61, Bal_59, Bal_56, Bal_49, Bal_47, Bal_43, Bal_42, Bal_40, Bal_38, Bal_32, Bal_29, Bal_27, Bal_23, Bal_21, Bal_20, Bal_5, Bal_4
Hap_3 (n:11)	Du_32, Du_25, Du_15, Du_14, Du_13, Du_3, Bal_50, Bal_39, Bal_26, Bal_25, Bal_13
Hap_4 (n:3)	Bal_68, Bal_54, Bal_18
Hap_5 (n:3)	Bal_55, Bal_33, Bal_11
Hap_6 (n:1)	Bal_36
Hap_7 (n:2)	Bal_8, Bal_7

A leggyakoribb 1-es haplotípust (Hap\_1) 64 kősüllő egyed hordozta, köztük vegyesen találhatóak mindhárom populációból (Balaton-Bal, Tisza\_Holt-Körös-THK, Duna-Du) minták. A Hap\_1 haplotípuson kívül, a Hap\_2 volt a másik, mely mindegyik populációban jelen volt. A Hap\_3-as haplotípusba sorolódó 11 egyed részben dunai, részben balatoni volt. A maradék 4 haplotípusban (Hap\_4, Hap\_5, Hap\_6, Hap\_7) csak balatoni minták fordultak elő. A balatoni kősüllők tehát mindegyik, az állományok vizsgálatakor meghatározott haplotípust hordozták, és 4 szekvencia változat is található összesen 9 egyednél, mely csak ezt a populációt jellemzi. Érdekes megfigyelni, hogy a PopArt szoftver által készített hálózati ábrán (13. ábra) a 4, csak balatoni egyedek által hordozott haplotípusok (Hap\_4, Hap\_5, Hap\_6, Hap\_7) egymástól elkülönülve foglaltak helyet. Bár mitokondriálisan ezek a csoportok egymásból nem levezethetők, a mikroszatellit eredményekhez visszatérve látható, hogy a nukleáris genom esetén a PCoA ábra alapján (8. ábra) nincsenek külön csoportot alkotó egyedek az egyes populációkon belül. Az egyes haplotípusok egymásból evolúciósan levezethetők, nem volt szükség feltételezett haplotípusokat jelentő medián vektorok beiktatására a hálózati ábra készítésekor.





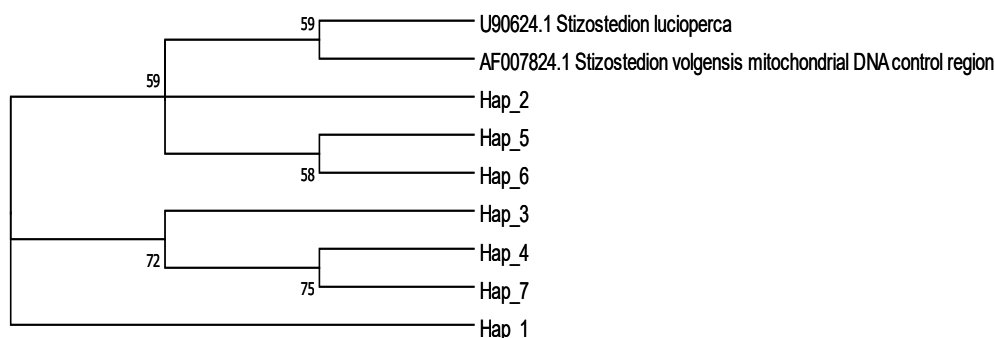
13. ábra: Kősüllő haplotípusok filogenetikai hálózati ábrázolása median-joining hálózattal a mitokondriális genom kontroll régiója alapján (zöld-Balaton, piros-Tisza\_Holt-Körös, sárga-Duna). A körök mérete az egyedszámot tükrözi.

Egy populáción belül a ritka haplotípusok, mint amilyen a 6-os és 7-es haplotípus (Hap\_6, Hap\_7) a Balaton esetében génmegőrzési szempontból felértékelődnek. Bár a balatoni populáció esetén a Hap\_2 nem számít ritkának, hiszen 19 egyed hordozta, a dunai populációnál már igen, mivel ott csak 3 egyed esetén sikerült azonosítani a mitokondriális genom kontroll régiójának ezt a szekvencia változatát. Utóbbi populációt nézve elmondhatjuk, hogy a dunai egyedek több, mint 70%-a a leggyakoribb Hap\_1-be tartozik. Ez az alacsony szintű mitokondriális diverzifikáltság összefügghet a korábbi mikroszatellit vizsgálatokban mért alacsony heterozigótahiánnyal. Bár a mitokondriális vizsgálatok során, a populációkon belüli egyedek közötti differenciáltság mérőszáma ( $F_{is}$ ) pont a Tisza-Holt-Körös egység esetén mutatta a legkisebb mértékű heterozigóta hiányt. Az NCBI adatbázisaiban végzett szekvencia ellenőrzés a nukleotid BLAST elemzéssel alátámasztotta az egyedek morfológiai jegyek által történt azonosítását. Mind a hét haplotípus esetén az illesztések és keresés után a program ugyanazokkal a szekvenciákkal találta a legnagyobb átfedést az adatbázisban, csak más-más hasonlósági százalékokkal (13.táblázat).

13. táblázat: Kősüllő D-loop haplotípusok összevetése az NCBI adatbázisában talált korábbi kősüllő mintával (Ac:AF007824; Faber & Stepien, 1998)

	Query	Identity
Hap_1	100%	97,20%
Hap_2	100%	97,31%
Hap_3	100%	97,08%
Hap_4	100%	96,60%
Hap_5	100%	97,31%
Hap_6	100%	97,20%
Hap_7	100%	96,60%

Az első helyen, és a legtöbb pontot az összehasonlítási rendszerben a Faber és Stepien munkája során leírt *Stizostedion volgensis* mitokondriális D-loop szekvencia (Génbanki azonosító: AF007824.1) kapta (Faber & Stepien, 1998). A *Stizostedion volgensis* név szintén a kősüllőt takarja, 2003-ban változott a genus elnevezése *Sander volgensis*-re (Nelson et al., 2003). Faberék vizsgálatában (elsősorban fogassüllőket vizsgáltak) egyetlen kősüllő szerepelt a minták között a fenti adatbázis azonosítóval, melyet a Dunából fogtak Pozsony környékén. A szekvenciát együttesen is ábrázoltuk saját haplotípusainkkal (13. ábra). A filogenetikai fán az általunk azonosított Hap\_2, Hap\_5 és Hap\_6 haplotípusok mellé sorolódott be, melyek közül egyedül a Hap\_2-es tartalmazott a Duna hazai szakaszából származó kősüllő mintákat (12. táblázat).



14. ábra: Kősüllő D-loop haplotípusok filogenetikai kapcsolatainak ábrázolása az AF007824.1 és U90624.1 referencia szekvenciával, a leggyakoribb 1-es csoportot gyökerként kijelölve.

Összességében megállapítható, hogy a vizsgált 849 bázispár hosszú D-loop régió alapján, a hazai vizsgált kősüllő populációk 7 haplotípust hordoznak, ami a vizsgált egyedek és élőhelyek számát tekintve inkább alacsony diverzifikáltságnak felel meg. Ha ezt összevetjük a mikroszatellit vizsgálatokkal, ott is megfigyeltük több esetben is a Hardy-Weinberg teszt alapján kimutatott kismértékű heterozigóta hiányt. Mindez arra enged következtetni, hogy a magyarországi kősüllő populációk genetikai változatossága csökken. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezek egyáltalán nem visszafordíthatatlan folyamatok. A pozitív irányú változásoknak már vannak jelei a diverzitási mutatókban, mely a legtöbb vizsgált mintaszámú balatoni populációban a diverzifikáltsági mutatók alapján növekvő egyedszámot feltételez, és több privát allélt és egyedi haplotípust is hordoz. A dunai populáció heterozigotizációs adatai is biztatóak, így megállapítható, hogy hazánkban a növekvő tendenciát figyelembe véve helyreállhat egy stabil, Hardy-Weinberg egyensúly állapotához közel levő, kellően változatos genetikai háttérrel rendelkező kősüllő állomány, hisz a genetikai erőforrásaink rendelkezésre állnak hozzá. Mivel jelenleg külföldről rendkívül kevés kősüllő mitokondriális D-loop szekvencia áll rendelkezésünkre, egy átfogóbb vizsgálatához további külföldi minták, és még több hazai egyed vizsgálata szükséges. A további populáció adatok, átgondolt telepítési szabályozással együtt segíthetik a genetikailag elkülönült állományok sajátosságainak megőrzését.

## 4.2. Az ezüstkárász

### 4.2.1 Az ezüstkárász D-loop régiójának vizsgálata

Az ezüstkárász esetében a 6 mintavételi helyről (Siófok (N=29), Ingó (N=18), Kányavár (N=17), Hőgyész (N=30), Siófok-Töreki tavak (N=19), Őszödi-berek (N=19)) összesen 132 egyed mitokondriális D-loop, azaz kontroll régióját vizsgáltam meg. A szekvenciák illesztése után minden egyed esetén egy 699 bázispár hosszú szekvencia állt rendelkezésemre. A konszenzus szekvenciák létrehozása után a DnaSP6 szoftver a 43 polimorf bázis hely alapján a 132 szekvenciából 22 haplotípust határozott meg, ami egy viszonylag magas érték, és nagy változatosságra utal ekkora mintaszám mellett. A polimorf helyeket és az egyes haplotípusonkénti bázis eltéréseket a 15. ábra szemlélteti. A haplotípusok a leggyakoribb 1-es csoporthoz (HapDI\_1) viszonyítva több esetben is csak egy-egy bázissal térnek el (HapDI\_7, HapDI\_16), néhány esetben azonban feltűnően nagy a különbség a csoportok között (HapDI\_4, HapDI\_11).

MATRIX	10	20	30	40
[	*	*	*	*
[				
HapDI_1	AACGAACCAAACGTCCTCGAAAACAGACTTCTAGTGACGACGC			
HapDI_2	.....C.....			
HapDI_3	.T.....G...A...C..GG..T.....C..G.C...AG..T			
HapDI_4	.TTAT.TT....A..GC..GGC.TGAGTC.ACGA.T.TA.T.T			
HapDI_5	.....G.....C.....			
HapDI_6	.....G.....C.....T			
HapDI_7	.....G.....			
HapDI_8	.T.....G...A...C..GG..T.....G.C...AG..T			
HapDI_9	.....G.....			
HapDI_10	T.....			
HapDI_11	.T.....G...A...C..GG..T.....C...AG..T			
HapDI_12	.....G.....A...C.....			
HapDI_13	.....G.....G.....AT			
HapDI_14	.....CT.GG..T.....C...AG..T			
HapDI_15	.....G.....T.....			
HapDI_16	.....G.....			
HapDI_17	.....A.....			
HapDI_18	.....G...AAA.....			
HapDI_19	.....G...G.....			
HapDI_20	.T.....G...A.....G.....G.C...AG..T			
HapDI_21	.....GA.....			
HapDI_22	.....GA.....G.....			

15. ábra: Az ezüstkárász D-loop haplotípusokat meghatározó bázis eltérések a leggyakoribb 1-es haplotípus csoport szekvenciájához viszonyítva.

Az egyes haplotípusok megoszlását populációnként a 14. táblázat mutatja be. A 22 szekvencia változathból 9 olyan haplotípus van, mely mindössze egy egyedben és 7, ami csak két mintában fordul elő, szemben a leggyakoribb 1-es haplotípussal (HapDI\_1), ami 46 egyedben van jelen. Ez az összmintaszám több, mint 35 %-a. A második legtöbb egyedben előforduló haplotípus a 7-es haplotípus (HapDI\_7) 33 egyeddel. Mindkét szekvencia változatra igaz, hogy az Őszödi-berek vizét leszámítva

mindegyik mintavételi helyről származó egyedek megtalálhatóak bennük. Ezekkel szemben a harmadik legnagyobb egyedszámmal bíró haplotípus a 21-es (HapDI\_21) csak az Őszödi-berek mintáiban fordult elő. Ez a populáció az egyetlen, ami két teljesen elkülönült haplotípusra oszlik csupán, melyek a HapDI\_21 17 db és a HapDI\_22-es haplotípus 2 mintával. Ezt leszámítva az összes populáció egyedei legalább egy másik mintavételi helyszínen előforduló haplotípus egyedeivel keverten találhatóak meg. A legtöbb, összesen 9 haplotípust a Siófoknál, a Balatonból mintázott populáció hordozta. Ezt követték a sorban a Kányavárnál és Hőgyészen mintázott ezüstkárász populációk, melyek egyformán 8-8 haplotípusra oszlottak. Ez a kányavári populáció esetén kiemelkedő mennyiségnek számít, figyelembe véve a siófoki (N=29) és hőgyészi (N=30) mintaszámokat, melyek majdnem a duplája a Kányaváron mintázott halak számának (N=17). A populációkat jellemző haplotípusok száma több szempontból is fontos. Egyfelől következtethetünk belőle a populációk változatosságára, ami alapján a siófoki és a hőgyészi populációk kiemelkedőek, másfelől a mindössze 2 haplotípusra osztható Őszödi-berek esetén is érdekes az eredmény, hisz bár ott a változatosság igen alacsony, 31 mintából csak 2 haplotípus mutatható ki, de szemben a többivel olyan egyedi haplotípusokat hordoz, melyek csak erre a populációra jellemzőek.

14. táblázat: Ezüstkárász egyedek haplotípus csoportokba sorolása mintavételi helyenként, ahol N: egyedszám, Sio: Siófok, Hog: Hőgyész, In: Ingó, Ob: Őszödi-berek, Kv: Kányavár, To: Siófok-Törek, a Hapl\_sorszámok pedig az egyes ezüstkárász haplotípus csoportokat jelölik

D-loop csoportok	N (Sio)	N (Hog)	N (In)	N (Ob)	N (Kv)	N (To)	N (összesen)
HapDI_1	9	11	10	0	7	9	46
HapDI_2	7	0	0	0	0	0	7
HapDI_3	2	0	0	0	0	0	2
HapDI_4	1	0	0	0	0	2	3
HapDI_5	2	0	0	0	0	0	2
HapDI_6	1	0	0	0	0	0	1
HapDI_7	5	12	5	0	4	7	33
HapDI_8	1	0	0	0	1	0	2
HapDI_9	1	1	0	0	0	0	2
HapDI_10	0	0	0	0	0	1	1
HapDI_11	0	2	0	0	0	0	2
HapDI_12	0	1	0	0	0	0	1
HapDI_13	0	1	2	0	0	0	3
HapDI_14	0	1	0	0	0	0	1
HapDI_15	0	1	0	0	0	0	1
HapDI_16	0	0	1	0	1	0	2
HapDI_17	0	0	0	0	1	0	1
HapDI_18	0	0	0	0	1	0	1
HapDI_19	0	0	0	0	1	0	1
HapDI_20	0	0	0	0	1	0	1
HapDI_21	0	0	0	17	0	0	17
HapDI_22	0	0	0	2	0	0	2

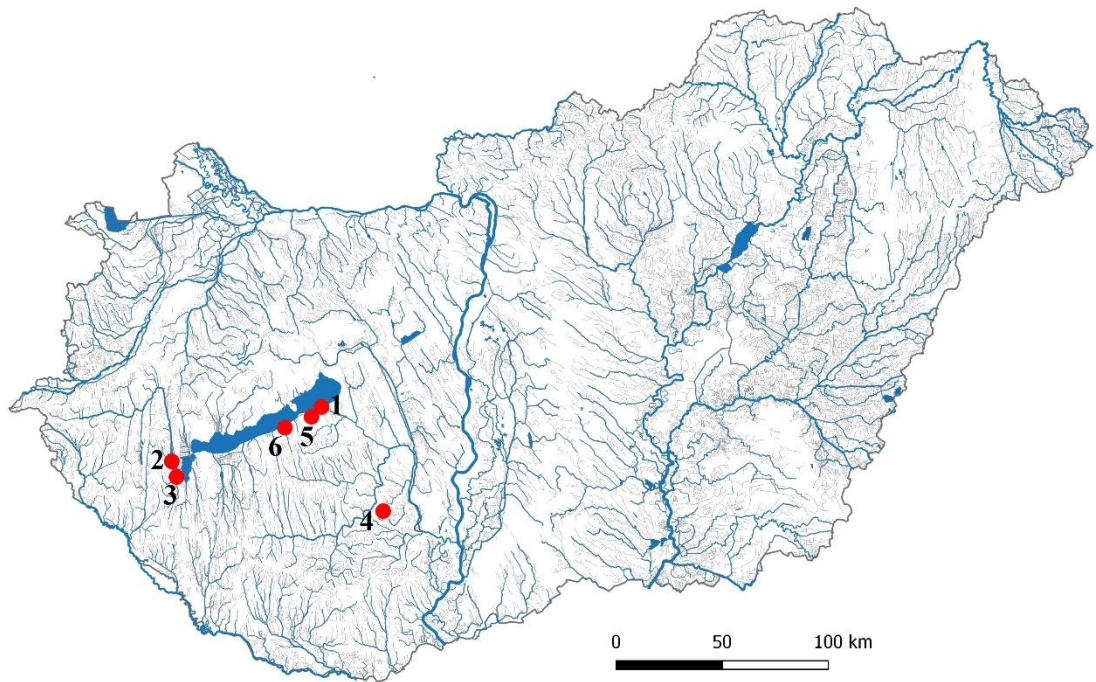
A haplotípusokat meghatározó 43 variábilis bázis helyből 35 bizonyult filogenetikailag informatív helynek, de mindegyik pozíció csupán két bázis

variációval. A haplotípus diverzitás az összes szekvenciára nézve (H)  $0,800 \pm 0,023$ , míg a nukleotid diverzitás értéke ( $\pi$ )  $0,006 \pm 0,001$ , a Tajima féle differenciáltság (D) pedig  $-1,57$ . A populációkra külön-külön számított értékeket a 15. táblázat szemlélteti.

15.táblázat: A haplotípus (gén) diverzitás és a nukleotid diverzitás bázishelyenként a vizsgált ezüstkárász populációk esetében, ahol H: a hordozott haplotípusok száma, Hd a haplotípus diverzitás,  $\pi$  a nukleotid diverzitás, SSD a diverzitás mutatók szórás (SD) értéke, Fs az Fu-féle Fs, D pedig a Tajima féle differenciáltság.

Populáció	H	Hd	SSD (h) ±	$\pi$	SSD ( $\pi$ ) ±	Fs	D
Siófok	9	0,83	0,04	0,11	0,04	1,02	-1,43
Hőgyész	8	0,72	0,05	0,06	0,01	-0,22	-1,08
Ingó	4	0,63	0,09	0,02	0,008	0,32	0,13
Őszödi-berek	2	0,19	0,11	0,004	0,002	-0,05	-0,56
Kányavár	8	0,8	0,08	0,07	0,02	-0,94	-1,11
Törek	4	0,66	0,07	0,13	0,06	6,41	-1,11

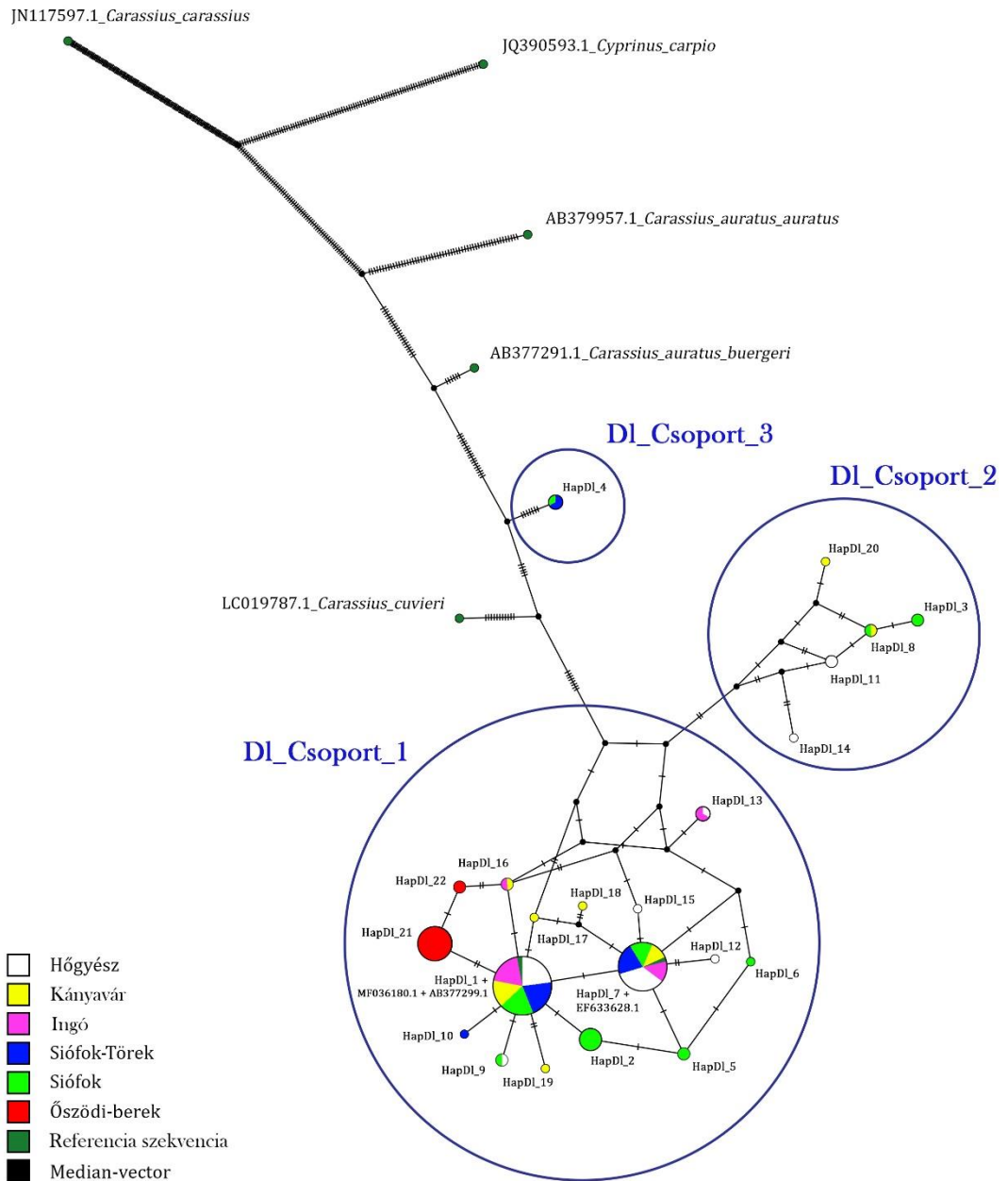
A legmagasabb haplotípus diverzitási értéket a Siófokon mintázott egyedek mutatták, míg nukleotid diverzitás esetében a Siófok-Törekli tavak ezüstkárász populációja. Bár a Siófok-Törekli minták csak 4 haplotípusba sorolódnak, ezért is az alacsony haplotípus diverzitási szám, de két egyed is a 4-es haplotípusba (HapDI\_4) került. Ez a szekvencia változat tartalmazta a legtöbb polimorf bázist a többi haplotípushoz viszonyítva, így a nukleotid diverzitás értéke magasabb. A legalacsonyabb értékek mindkét mérőszám esetén az Őszödi-bereknél (Öb) mutathatóak ki. A Tajima-féle differenciáltság mutatója (D), itt is negatív értéket vett föl, akárcsak a Fu-féle Fs értéke, ami alacsony mértékű populáció növekedést jelez. Mindkét mérőszám esetében pozitív értéket egyedül az Ingói (In) minták mutattak. Az Ingói mellett pozitív, ráadásul kiemelkedően magas (6,41) Fs értéket mutatott a Siófok-Törekli ezüstkárász populáció. A Siófok-Törekli halastavak rendszere összeköttetésben van a Balatonnal a Cinege patakon keresztül. A mintavételek a 10-es tóból történtek, mely a Balatonhoz legközelebbi a rendszerből és egyedül a korábbi 11-es, a mintavételkor nem üzemelő, Törekli-láp néven nevezett egység választja el a tótól. Az eredmény több mint valószínű, hogy az alacsonyabb mintaszámú és a két 4-es haplotípusba sorolódott szekvencia miatti magas nukleotid diverzitásnak köszönhető. Ezt a diverzitást a többitől kiemelkedően eltérő nukleotid sorrend okozta, akárcsak a siófoki (Balaton) 1,02-es értéket. A többi vízterülettel teljesen független, azokkal élő összeköttetésben nem álló, zárt Hőgyésvi-horgászó esetében mindkét érték pozitív szelekcióra utaló, nullánál kisebb, értéket mutatott. Bár területileg Hőgyész a leginkább elkülönülő populáció a többitől (16. ábra), a haplotípusok evolúciós kapcsolatát bemutató hálózati ábra elemzéséből látszik, hogy genetikailag nem mutat jelentősebb eltérést a többitől (17. ábra).



16. ábra: Ezüstkárász mintavételi helyszínek piros pöttyökkel jelölve, ahol 1: Siófok, 2: Ingó, 3: Kányavár, 4: Hőgyész, 5: Siófok-tőreki tavak, 6: Őszödi-berek.

A hálózati ábrán (17.ábra) jól látható, hogy a két legtöbb egyedet magába foglaló (a körök mérete az egyes haplotípusokat hordozó egyedek számát tükrözi) 1-es és 7-es haplotípus (HapDI\_1, HapDI\_7) szinte minden populációból tartalmaz egyedet, kivéve az Őszödi-berek mintáit, melyek elkülönülnek és csak a pirossal jelölt HapDI\_21-es és HapDI\_22-es haplotípust hordozták. A hálózati ábra a mediánvektorokat figyelembevéve 3 nagyobb csoportra osztható (DI\_Csoport\_1, DI\_Csoport\_2, DI\_Csoport\_3). A haplotípusok nagy része a hálózati ábra alsó részén lévő 1-es csoportban találhatóak. A második csoportba (DI\_Csoport\_2) 5 haplotípus (HapDI\_3, HapDI\_8, HapDI\_11, HapDI\_14, HapDI\_20) különült el a többitől. Tőlük is távolabb helyezkedik el, teljesen különálló csoportot alkotva a HapDI\_4. A több vektornyi távolság több evolúciós lépést takar, így a kapott csoportok taxonómiai besorolását mindenképp érdemes ellenőrizni. Pláne az olyan morfológiailag nagyon hasonló csoportok esetén, mint a kárász nemzetség tagjai.





17. ábra: Az ezüstkárász haplotípusok, és a hozzájuk tartozó egyedeket bemutató Median-joining alapú hálózati ábra, ahol a zöld a siófoki, piros az ózödi-berek, fehér a hógyészi, sárga a kányavári, lila az ingói, a kék szín pedig a Siófok-Töröki mintákat szemlélteti. A fekete pontok a PopArt szoftver által beillesztett median vektorok, DI\_Group a haplotípus csoport. Sötét zöld színnel jelöltük a referencia szekvenciákat.

A taxonómiai besorolás egyik támpontja az NCBI GenBank-ban elérhető nukleotid adatbázis összehasonlító szekvencia vizsgálat (BLAST) volt. A kapott ezüstkárász haplotípusok standard nukleotid BLAST elemzése során 7 haplotípus (HapDI\_3, HapDI\_4, HapDI\_6, HapDI\_8, HapDI\_11, HapDI\_13, HapDI\_14) szekvenciája a 22-ből nagyobb hasonlóságot mutatott a kárász komplex más tagjaival, mint az ezüstkárászsal. Mindegyik haplotípus esetén a legnagyobb hasonlóságot mutató BLAST eredményeket a 15. táblázat szemlélteti.

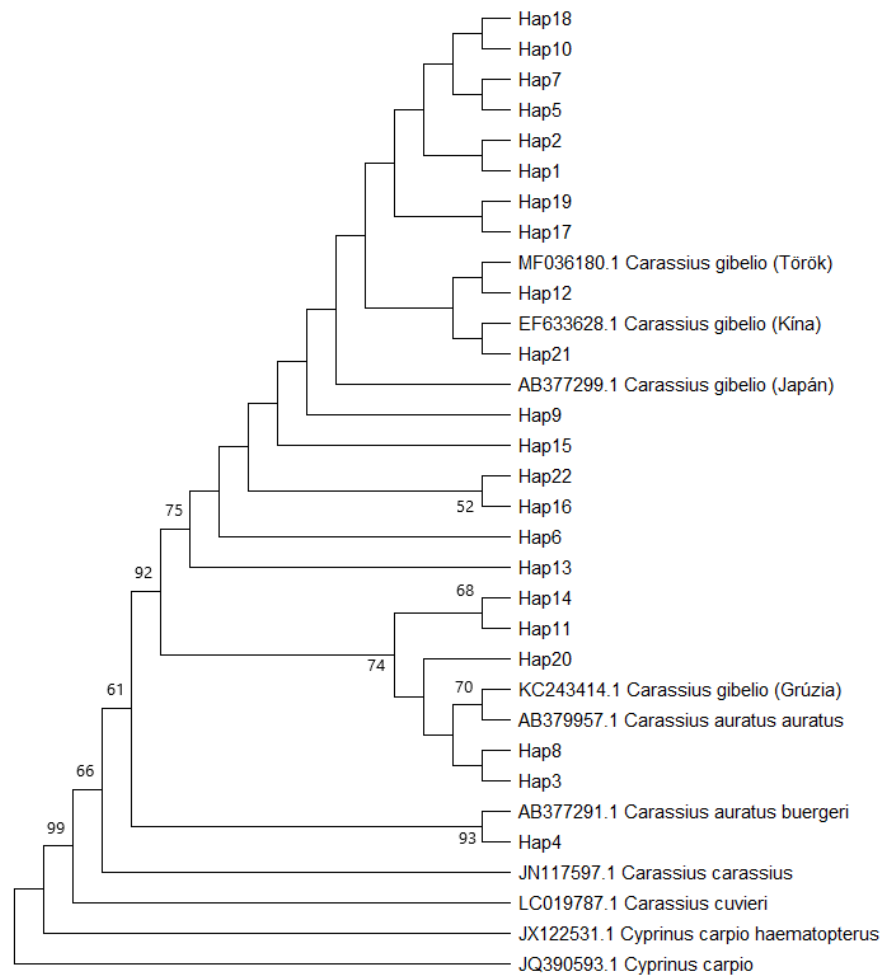
15. táblázat: Ezüstkárász haplotípusok azonosítása az NCBI BLAST programmal, génbanki azonosítóval és a kapott találatok százalékos értékelésével, ahol a „Query” az illesztett nukleotidok százalékát mutatja, az „Identity” pedig a találattal való átfedés százalékos értékét. Zölddel jelöltem a hálózati ábra (17-es ábra) alapján a 2-es D-loop csoportba, kékkel, a 3-as D-loop csoportba tartozó haplotípusokat.

D-loop	Blast azonosítás	Query	Identity	Azonosító
HapDI_1	<i>Carassius gibelio</i>	100%	100,00%	MF036180.1
HapDI_2	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,86%	MF036180.1
HapDI_3	<i>Carassius auratus auratus</i>	100%	99,86%	AB379949.1
HapDI_4	<i>Carassius auratus buergeri</i>	100%	99,43%	AB377291.1
HapDI_5	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,86%	MF036179.1
HapDI_6	<i>Carassius auratus</i>	100%	99,86%	FJ817324.1
HapDI_7	<i>Carassius gibelio</i>	100%	100,00%	MF036179.1
HapDI_8	<i>Carassius auratus auratus</i>	100%	99,86%	AB379949.1
HapDI_9	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,86%	MF036180.1
HapDI_10	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,86%	MF036180.1
HapDI_11	<i>Carassius auratus auratus</i>	100%	99,71%	AB379949.1
HapDI_12	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,71%	MF036179.1
HapDI_13	<i>Carassius auratus gibelio</i>	100%	100,00%	EF633617.1
HapDI_14	<i>Carassius auratus</i>	100%	100,00%	FJ817323.1
HapDI_15	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,00%	KU668573.1
HapDI_16	<i>Carassius gibelio</i>	100%	100,00%	MF083605.1
HapDI_17	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,86%	MF036180.1
HapDI_18	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,57%	MF036179.1
HapDI_19	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,86%	MF036180.1
HapDI_20	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,43%	KU668576.1
HapDI_21	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,71%	MF036180.1
HapDI_22	<i>Carassius gibelio</i>	100%	99,71%	MF083605.1

A BLAST illesztések alapján a HapDI\_3, HapDI\_6, HapDI\_8, HapDI\_11 és HapDI\_14 mind a *Carassius auratus auratus*-t, vagyis az aranyhalat takarja. Az ezüstkárász fejezetben ismertetett taxonómiai ellentmondásokat a találati eredmények jól tükrözik. Míg az általunk vizsgált HapDI\_6-os haplotípussal 99,86%-os, illetve a HapDI\_14-essel 100%-os átfedést mutató FJ817324.1-es (Jung et al., 2009) azonosító számmal rendelkező aranyhal szekvencia „*Crassius auratus* (goldfish)” néven volt az adatbázisban, addig az AB379949.1-es szekvenciát Komiyama és munkatársai már „*Carassius auratus auratus* (gold crucian carp)” néven tüntették fel a rendszerben (Komiyama et al., 2009). Munkájukban az általuk Japánban vizsgált aranyhalakat az ezüstkárász (*Carassius auratus gibelio*) változataként írták le. Szintén az ő vizsgálatuk során kapott haplotípussal (AB377291.1) mutat 99,43%-os egyezést az általunk vizsgált HapDI\_4-es haplotípus. A japán csoport a szekvenciát a Ginbuna-val (*Carassius auratus buergeri*) azonosítja, mely egy japán aranyhal változat. Az ezüstkárász is kétféle elnevezéssel szerepelt a találatok között. A legtöbb esetben haplotípusaink egy török kutatás során meghatározott szekvenciákkal (MF083605.1, MF036180.1, MF036179.1) mutattak átfedést (Agdamar & Tarkan, 2019), melyeket az adatbázisba az ezüstkárász (*Carassius gibelio*) egyik leggyakrabban használt angol megfelelőjeként „silver crucian carp” elnevezéssel töltötték fel. A 13-as haplotípus



(HapDI\_13) esetén azonosított EF633617.1 szekvencia Li és Gui 2008-as munkája nyomán került az adatbázisba (Li & Gui, 2008).



18. ábra: Ezüstkárász haplotípusok a mitokondriális genom kontroll régiója alapján, gyökérként egy ponty (*Cyprinus carpio*) D-loop szekvenciát (AC: JQ390593.1) kiválasztva. (A filogenetikai fa Neighbour Joining illesztéssel, Tamura-Nei távolságot figyelembe véve 1000-es bootstrap értéket használva készült a MEGA-X szoftverrel)

A filogenetikai fán (18. ábra), akárcsak a hálózati ábrán (17. ábra) a BLAST elemzés során nem ezüstkárászként azonosított szekvenciák nagy része (HapDI\_3, HapDI\_8, HapDI\_11, HapDI\_14) elkülönült csoportot (hálózati ábrán: DI\_Csoport\_2) alkottak. Ide sorolódott a 20-as haplotípus (HapDI\_20) is, mely egy ázsiai eredetű szekvenciával (KU668576.1; Wang et al., 2016) mutat kicsivel több, mint 99%-os egyezést (15. táblázat). A filogenetikai fára felkerültek a szakirodalomban *Carassius auratus* komplex néven ismert kárász nemzetség egyéb tagjai is. Az egyes szekvenciák származása és ismertetése a 8-as számú mellékletben találhatóak. A referenciák közül a nem *Carassius gibelio*-ként azonosított szekvenciák jól láthatóan elkülönültek a fán. Hozzájuk sorolódtak az általunk 4-es haplotípusba került minták, melyek a legnagyobb hasonlóságot a *Carassius auratus buergeri*-vel mutatták. Egyetlen az NCBI adatbázisban *Carassius gibelio*-ként szereplő szekvencia (KC243414.1) beékelődött a *Carassius auratus*-ok közé. Ezt a szekvenciát egy Grúz kutatócsoport használta, mint *Crassius auratus gibelio* referencia szekvencia Törökországból a Grúz vizek kárász nemzetségének taxonómiai besorolásához (Japoshvili et al., 2013). A szakirodalmi

bizonytalanságok miatt, a saját haplotípus szekvenciáink taxonómiai besorolásának megerősítése érdekében, valamint a kontroll régió taxonómiai elkülönítésre alkalmas markerként való működésének ellenőrzésére, az egyes D-loop haplotípusokat hordozó szekvenciákat megvizsgáltuk a mitokondriális genom Citokróm *b* (Cyt.B.) és Citokróm oxidáz 1-es alegységére (Co.I.) is. A markerek kiválasztásakor a taxonómiai vizsgálatokkal foglalkozó szakirodalmi adatokat vettük figyelembe. A kontroll régióánál alkalmazott vizsgálati módszerek mindkét új marker esetében működőképesekek voltak. A PCR-ek során mindegyik mintából sikerült felszaporítani a vizsgálni kívánt régiókat, a szekvenáló reakció során pedig sikerült meghatározni az egyes szekvenciákat meghatározó bázis sorrendeket.

#### 4.2.2 Az ezüstkárász Citokróm *b* régiójának vizsgálata

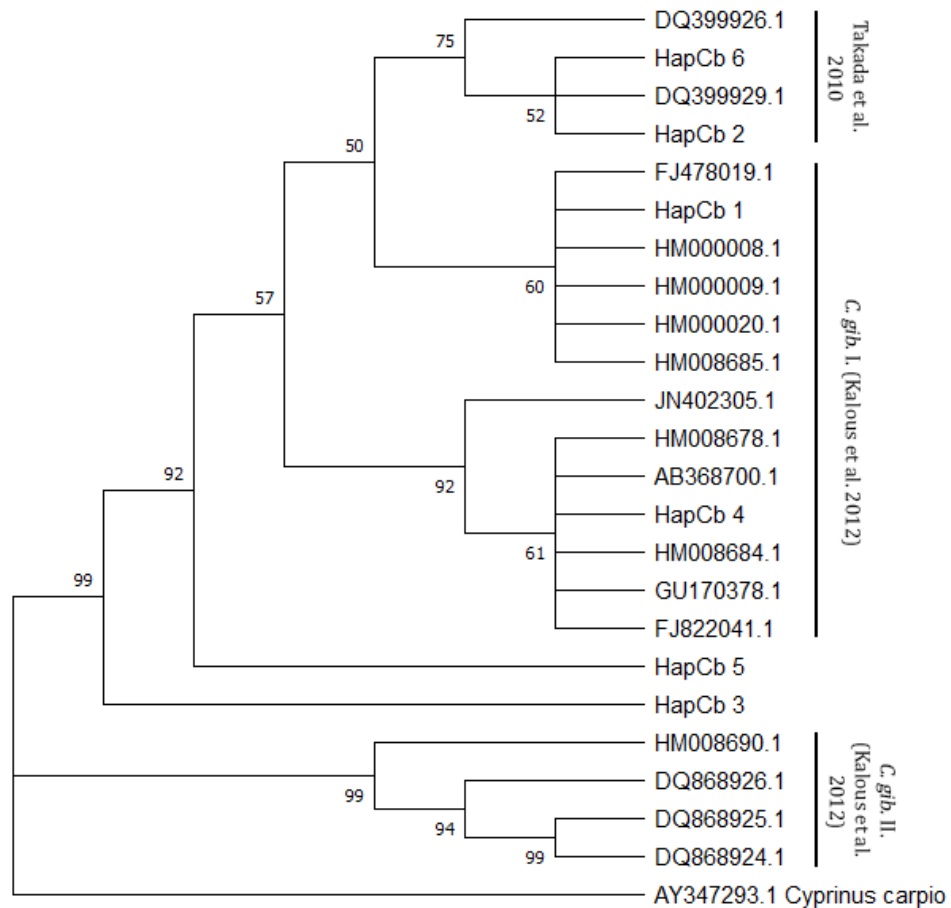
Kalous és munkatársai a Citokróm *b* régió vizsgálatai alapján írták le az ezüstkárász neotípusát, mely vizsgálat alapján javaslatot tettek a *Carassius gibelio* 2 külön alfajra bontására (Mongol és Európai-Ázsiai) is (Kalous et al., 2012). A Citokróm *b* vizsgálat során a DnaSP6 szoftver a korábbi kontroll régió alapján meghatározott 22 haplotípus referencia egyedeiből a nukleotid diverzitás alapján mindössze 6 haplotípust azonosított. Az egyes haplotípusokat és hozzájuk sorolódó D-loop régióra nézve polimorf bázisokat tartalmazó szekvenciákat a 16. táblázat mutatja be. A haplotípusokat meghatározó polimorf bázis helyeket a 9. melléklet tartalmazza.

16. táblázat: A Citokróm *b* régió alapján megkülönböztetett 6 haplotípus nukleotid BLAST eredménye, a kapott találatok azonosítója és query (a kereső szekvencia hossza a teljes hossz %-ában), illetve identity (szekvencia aznosság %-a) értékei, valamint az egyes D-loop csoportok megoszlása a Citokróm *b* régiót hordozó szekvencia csoportokban.

CytB. Csoportok	D-loop haplotípusok megoszlása a CytB csoportokban											Blast azonosítás	Query	Identity	Azonosító (Accession number)
	22	19	18	15	2	1									
HapCb_1	22	19	18	15	2	1						<i>C. gibelio</i>	100%	100%	KX601122.1
HapCb_2	21	17	16	14	12	10	9	8	5	3		<i>C. gibelio</i>	100%	100%	HM000019.1
HapCb_3	20	11	7									<i>C. gibelio</i>	100%	100%	KX601124.1
HapCb_4	13											<i>C. gibelio</i>	100%	99,53%	HQ689899.1
HapCb_5	6											<i>C. gibelio</i>	100%	100%	MG281946.1
HapCb_6	4											<i>C. gibelio</i>	100%	99,91%	LC337602.1

A legtöbb D-loop haplotípust a HapCb\_2 csoport hordozta. A HapDI\_4-es, HapDI\_6-os és HapDI\_11-es D-loop haplotípust, amiket a korábbi BLAST elemzés a *Carassius auratus auratus* és *Carassius auratus buergeri* szekvenciákkal azonosított, a mitokondriális genom Citokróm *b* régiójában mutatott nukleotid diverzitásuk alapján itt is külön csoportba kerültek. Érdekes azonban, hogy míg a 13-as haplotípus (HapDI\_13), akár csak a 20-as (HapDI\_20) a Cyt.B. esetén szintén a ritkább szekvenciák közé sorolódik, addig a másik marker alapján eltérő HapDI\_8-as, HapDI\_3-as és HapDI\_14-es haplotípus beolvadt a leggyakoribb Citokróm *b* csoportba a HapCb\_1-esbe. A csoportok BLAST elemzése jóval egységesebb képet mutatott. Mindegyik szekvencia *Carassius gibelio* szekvenciákkal került egy besorolásba, ráadásul szemben a D-loop értékkel a legtöbb esetben mind a query, mind az identity értéknél 100%-os egyezéssel. A szekvenciák további elemzéséhez a kapott 6 Citokróm

*b* haplotípust (HapCb\_1, HapCb\_2, HapCb\_3, HapCb\_4, HapCb\_5, HapCb\_6) beillesztettük a Kalous és munkatársai által vizsgált szekvenciák filogenetikai törzsfájára (18. ábra). A törzsfára felkerültek még a Takada és munkatársai által 2010-ben publikált, az Európára jellemző *Carassius* haplotípusokat reprezentáló V. klád *Carassius gibelio* mintái is (Takada et al., 2010). Az ide tartozó szekvenciákat (DQ399926.1, DQ399929.1), ugyanúgy a cseh Kalous és munkatársai (2007) töltötték fel az adatbázisba egy korábbi, az Elbán végzett vizsgálat során.



18. ábra: A Citokróm *b* haplotípusok elhelyezkedése a filogenetikai fán, összevetve a Kalous és munkatársai által meghatározott 2 ezüstkárász alcsoporttal és a Takada és munkatársai által Európai ezüstkárász kládnak jelölt cseh eredetű szekvenciákkal. (A filogenetikai fa Median Joining illesztéssel, Tamura-Nei távolságot figyelembe véve 1000-es bootstrap értéket használva készült a MEGA-X szoftverrel)

Bár a csehek munkájában jól elkülönült a két *Carassius gibelio* csoport, ahol a *C. gib. I.* -es az Európai-Ázsiai, míg a *C. gib. II.* -es a mongol mintákat hordozta, az általunk azonosított haplotípusok mégsem egyöntetűen a várt *C.gib. I.*-es szekvenciák közé sorolódtak be. Kettő csoport, a HapCb\_5 és a HapCb\_3 a csehek által elkülönített mongol csoporthoz állt közelebb. Bár a nukleotid BLAST elemzés alapján az általunk meghatározott Citokróm *b* haplotípusok az adatbázis alapján is a *Carassius gibelio* szekvenciákkal mutatták a legnagyobb átfedést, az ehhez a 2 csoporthoz (HapCb\_5, HapCb\_3) tartozó D-loop haplotípusokat reprezentáló minták fele azok közül került ki, melyek a D-loop elemzés során közelebbi hasonlóságot mutattak a *Carassius auratus auratus*-sal. Az eredményt árnyalja, hogy szintén a HapCb\_3 haplotípusba került a kontroll régió haplotípusai közül a HapDI\_7-et hordozó egyed, ami a D-loop régió esetében a második legtöbb esetben kimutatott szekvencia változatnak bizonyult.

#### 4.2.3 Az ezüstkárász Citokróm oxidáz 1 vizsgálata

A vizsgálatok a Citokróm oxidáz 1 (Co.I.) esetén is működtek, az anyagok és módszerek fejezetben ismertetett protokollokkal. Mindegyik minta esetén sikerült a vizsgálni kívánt régiót PCR-rel felsokszorozni, és a szekvenciák bázis sorrendjét a szekvenálási reakció során meghatározni. Az így kapott haplotípus csoportokat és a hozzájuk sorolódó D-loop haplotípusokat a 17. táblázat mutatja be. A haplotípusokat meghatározó bázisokat a 9. melléklet tartalmazza. A mitokondriális genom 3 régiójából a Co.I. marker mutatta ki a legkevesebb, mindössze 4 haplotípus csoportot.

17. táblázat: Az ezüstkárász esetén kimutatott 4 db Co.I. haplotípus és a hozzájuk sorolódó D-loop haplotípusok, valamint a BLAST elemzés során kapott legerősebb találat eredményei.

CoI Csoportok	D-loop haplotípusok megoszlása a CoI csoportokban																BLAST találat	
Co.I._1	9																<i>Carassius auratus</i>	
Co.I._2	8	6	5	4	3	22	21	1	19	18	17	16	15	14	12	10	1	<i>Carassius gibelio</i>
Co.I._3	7	20	11															<i>Carassius auratus</i>
Co.I._4	13																	<i>Carassius gibelio</i>

A 4 csoport BLAST analizisének eredménye felhívja a figyelmet az online adatbázisok korlátaira, és a feltöltött adatok kritikus kezelésére. Az NCBI BLAST standard nukleotid elemzése 2 citokróm haplotípust is (Co.I.\_1, Co.I.\_3) *Carassius auratus*ként azonosított (17. táblázat). A Citokróm oxidáz 1 régiót bárkód-régióknak is nevezik. A szekvencia alapján elvégzhető keresésre egy külön adatbázist is létrehozta. A BOLD (The Barcode of Life Data System) rendszerben (web) szintén lehet a szekvenciák FASTA formátumú illesztése alapján azonosságokat keresni. A 4 db Citokróm oxidáz 1 haplotípus találati eredményeit a 18. táblázat szemlélteti.

18. táblázat: Ezüstkárász Citokróm oxidáz 1 haplotípusok BOLD azonosítása

CoI Csoportok	Bárkód (BOLD) azonosítás	Similitary
Co.I._1	<i>Carassius auratus</i>	99,83%
Co.I._2	<i>Carassius gibelio</i>	100%
Co.I._3	<i>Carassius auratus</i>	100%
Co.I._4	<i>Carassius gibelio</i>	100%

Az eredmények átfedésben álltak a két adatbázisban. Ennek ellenére a szekvencia azonosításokat nagy körültekintéssel és minél több molekuláris genetikai markerrel érdemes ellenőrizni, mert az ilyen jellegű informatikai adatbázisok még nem képesek önállóan kiszűrni a hibákat, melyek a pontatlan feltöltésekből, rosszul meghatározott szekvencia sorrendekből, téves rendszertani egységekbe osztott egyedektől származó minták elemzéséből adódnak (Deagle et al., 2014, Buhay, 2009). Bár a tanulmányok elsősorban a BOLD adatbázist emelik ki és a Co.I. marker használata során felmerülő tévedések lehetőségét, jelen munka megerősíti, hogy a tévesen feltöltött szekvenciák, nem a Citokróm oxidáz gén 1-es alegységének

sajátosságai. A téves azonosítás egy olyan csoportban, mint a kárász-komplex tagjai, minden marker esetén előfordulhat, hiszen már a mintázott egyedek fenotípusos azonosítása is nehézségekbe ütközik. Ezen segíthetne ezüstkárász esetén a leírt neotípusok (Kalous et al., 2012) figyelembevétele. Mindazonáltal annyi fenotípusos bélyeget felvenni, amik alapján egy neotípusba az adott halat be lehetne sorolni, nagyobb egyedszám esetén a helyszíni mintavételkor életszerűtlen. A citokróm oxidáz alapú genetikai elemzésüket összevetve a sajátunkkal, és figyelembe véve a más mitokondriális régiók (Co.I., D-loop) esetén, más taxonómiai besorolású egyedekkel mutatott filogenetikai távolságokat, mint a D-loop 4-es haplotípus és a *Carassius auratus buergeri* esete, nem tekinthető megbízhatónak a kárász-komplex tagjainak elkülönítésére hazánkban.

A három mitokondriális markerrel (D-loop, Cyt.B., Co.I.) történt vizsgálat alapján összességében megállapítható, hogy a mitokondriális genom vizsgálatához általánosan használt Sanger-féle szekvenálási módszer az ezüstkárász esetében is működik. A pontyfélék családjában általánosan alkalmazott primer párokkal az ezüstkárász esetén is lehetséges a termékek felszaporítása. A hat mintavételi helyről gyűjtött, és sikeresen elemzett 132 mintából a D-loop régió alapján 22 haplotípust tudtam elkülöníteni, melyeknek több mint a fele csak 1 vagy 2 egyed tartalmazott, ez alapján elmondható, hogy a hazai vizekben több ritka haplotípus is megtalálható. Az Őszödi-berek populációja nem csak földrajzilag izolált, de genetikailag is elkülönül a haplotípusok alapján. Bár a hógyszí állomány földrajzilag teljesen elszigetelt és semmiféle kapcsolatban nem áll a többi mintavételi hellyel, mégsem alkot elkülönült egységet semmilyen más szempontból. A D-loop haplotípusok alapján a Siófok-Töreki populáció is magas differenciáltságot mutat a többihez képest. Innen mutathatók ki a legeltérőbb egyedek. Ezek a halak bár nem nagy számban, de feltűnően különböző genetikai háttérrel vannak jelen vizeinkben. Az eltérések miatt, melyeket a filogenetikai ábrák (17. ábra, 18. ábra) is alátámasztottak, vontam be a vizsgálatba a Cyt.B. és Co.I. markereket. A faj azonosítás során az NCBI és BOLD szekvencia adatbázisok segítségével hasonlítottam össze az egyes haplotípusokat az adatbázisban szereplő más mintákkal. Az általam eltérőként azonosított minták nemcsak a D-loop, de a Citokróm oxidáz 1-es alegység alapján is nagyobb átfedést mutattak a kárász-komplex más tagjaival. A legpontosabb, az ezüstkárász fenotípussal átfedő eredményeket a Citokróm *b* szekvenciák adták. A referencia szekvenciákkal való egyezés mellett, azok filogenetikai kapcsolatának ábrázolása során több helyen is kapcsolat tűnik fel ázsiai eredetű szekvenciákkal. Érdekes, hogy a szakirodalomban (Pentinsaari et al., 2016) kiemelten faj-azonosításra ajánlott bárkód rendszer (Co.I. marker) alapján csak 4 haplotípus csoportot kaptunk, ami taxonómiai azonosítás szempontjából pontosabb eredményt is adhatna, de a 4-ből a BOLD, akár csak a BLAST 2-t azonosított csak *Carassius gibelio*-ként.

### 4.3. A garda

#### 4.3.1. Mikroszatellit markerek adaptációja garda fajra

Mivel a gardát (*Pelecus cultratus*) mindeközéig nem vizsgálták mikroszatellit markerekkel, nagyon kevés előzetes vizsgálat, vagy kiindulási alap állt rendelkezésemre a vizsgálatok megkezdésekor. A mitokondriális markerek mellett célt volt egy átfogóbb fajspecifikus vizsgálat mikroszatellit markerekkel. Mivel kősüllő esetén is bizonyítottan működött a fajok közötti marker adaptáció, első körben a közeli rokon fajokból igyekeztem már működő mikroszatellit markereket adaptálni (Baerwald & May, 2004; Barinova et al., 2004; Urbánková et al., 2013; Hosseinnia et al., 2014) (Melléklet 11.). Akárcsak a kősüllő esetén, a változó értékek itt is elsősorban a MgCl<sub>2</sub> mennyisége, a primerek feltapadási hőmérséklete és a ciklusszámok voltak. Összesen 11, a szakirodalom alapján választott mikroszatellit markert teszteltem (19. táblázat). A 11 markerből a protokollok optimalizálása után 5 marker esetén sikerült PCR terméket felszaporítani (Albi22, Albi61, Albi462, Gob28, CypG24), de ezek közül 2 marker esetén (Albi462, CypG24) annyi átermék és egyéb fragment szaporodott fel, hogy az eredmények kiértékelhetetlenek voltak, és további optimalizálással sem sikerült csökkenteni a „zaj” mennyiségét. Három marker (Gob28, B11, Albi22) a kapilláris gélelektroforézis eredményei alapján monomorfnak bizonyult. Egyetlen mikroszatellit marker, az Albi 61 bizonyult polimorfnak, de az is pusztán 3 alléllal rendelkezett. Egyetlen három allélos mikroszatellit marker önmagában populációgenetikai vizsgálatra nem alkalmas.

19. táblázat: Teszt mikroszatellit markerek garda vizsgálatokhoz, ahol - : nincs eredmény, + sikeres

	Azonosító	Adaptáció	Polimorfítás	Allél méret	MgCl <sub>2</sub>	Feltapadási hőmérséklet
Albi22	JX228956.1	+	-	129 bp	2	56 C°
Albi61	JX228957.1	+	+	111,115,121bp	2	56 C°
Albi462A	KC161205.1	+	-	-	-	-
Gob28	DQ207805.1	+	-	250 bp	2	53 C°
MFW19	DQ780025	-	-	-	-	-
CypG24	AY439142	+	-	-	2	52 C°
Rru3	AB112739	-	-	-	-	-
B11-153	FJ468350	-	-	-	-	-
B12-114	FJ468352	-	-	-	-	-
MFW1	Crooijmans et al. 1997	-	-	-	-	-
MFW9	Crooijmans et al. 1997	-	-	-	-	-

#### 4.3.2 A garda mitokondriális vizsgálata

A három garda (*Pelecus cultratus*) populáció (Balaton, Fertő, Lengyelország) mitokondriális D-loop régiójának vizsgálata során 125 szekvenciát tisztáztam és illesztettem. Az így kapott 803 bázispár hosszú konszenzus szekvenciák szoftveres elemzésekor 5 haplotípust mutattam ki (19. ábra). A haplotípus csoportokat meghatározó 4 polimorf bázis helyből kettő bizonyult filogenetikai szempontból informatív pozíciónak.

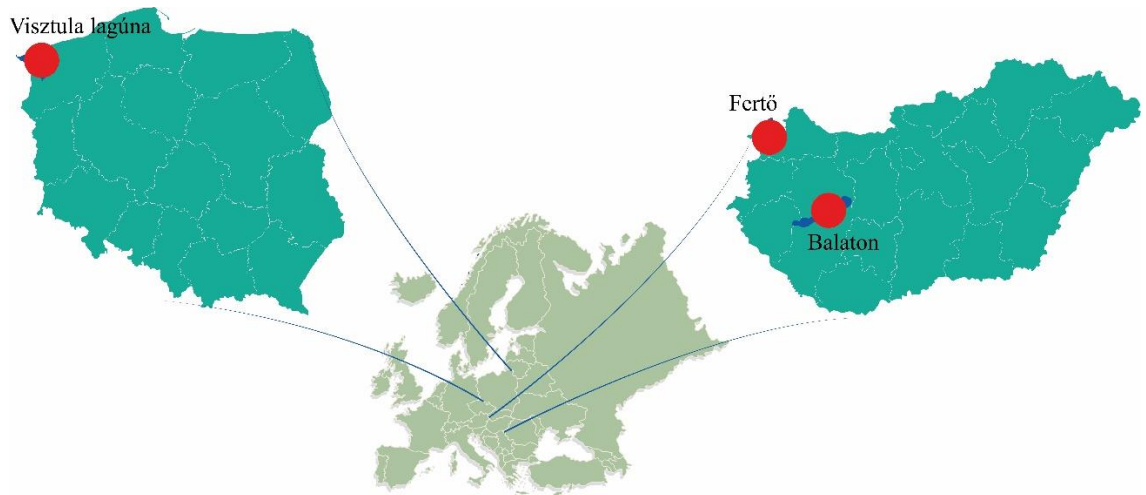
```

MATRIX
[
[
Hap_1 AGAC
Hap_2 ..G.
Hap_3 .A..
Hap_4 ...T
Hap_5 G...
;
END;

```

19. ábra: Garda populációk mitokondriális genomjának kontroll régiójában található polimorf bázisok és azok alapján meghatározott 4 haplotípus csoport.

A haplotípus csoportokat a 20. táblázat szemlélteti. Mind a mintaszámok, mind a mintavételi helyek közötti földrajzi távolság (20. ábra) alapján ez a változatosság rendkívül alacsony, gondoljunk csak a 8 mintával több ezüstkárász állomány során kapott 22 haplotípusra. Az egyedek többsége ráadásul (104 minta) a 125-ből a leggyakoribb 1-es haplotípust hordozza. A Lengyelországban található Visztulalagúnából származó minták mindegyike ebbe a leggyakoribb csoportba tartozik.

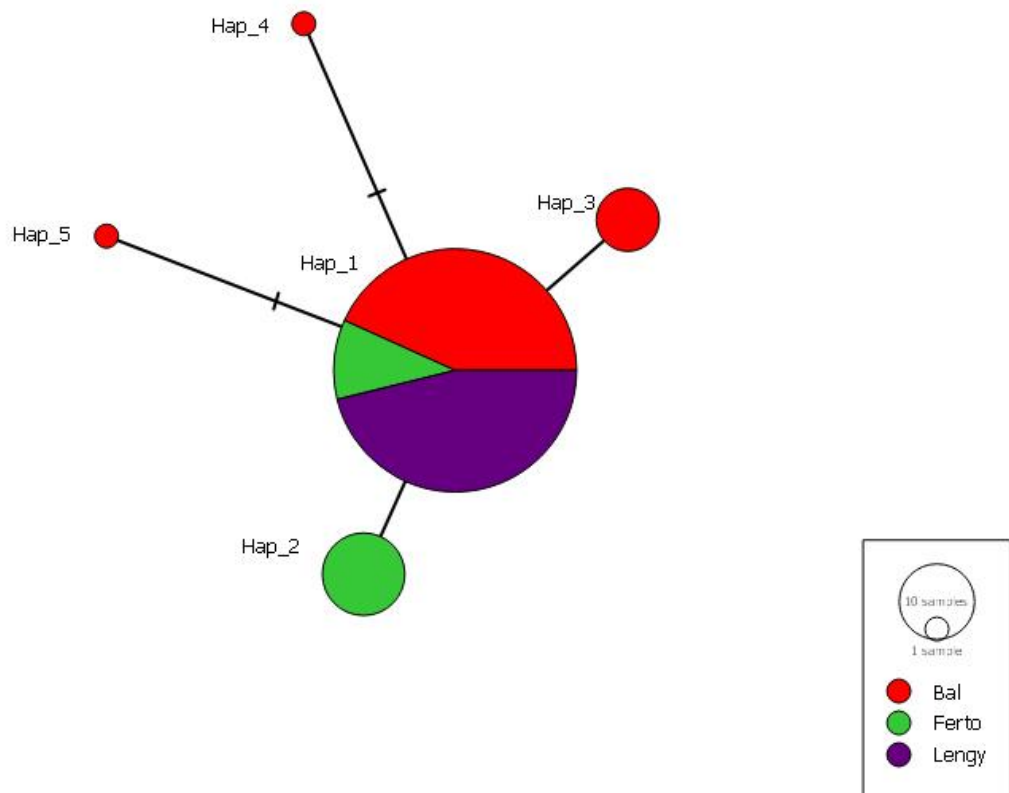


20. ábra: Garda mintavételi helyek jobb oldalt kiemelve a magyarországi mintavételi pontokat, bal oldalt pedig a lengyel mintázás helyszínét.

20. táblázat: Garda minták haplotípusai és az azt hordozó egyedek, ahol BG: Balaton, LG: Lengyel, FG: Fertő.

Hap_1	LG47 LG48 LG46 LG45 LG44 LG43 LG42 LG41 LG40 LG39 LG38 LG37 LG36 LG35 LG34 LG33 LG32 LG31 LG30 LG29 LG28 LG27 LG26 LG25 LG24 LG23 LG22 LG21 LG20 LG19 LG18 LG17 LG16 LG15 LG14 LG13 LG12 LG11 LG10 LG9 LG8 LG7 LG6 LG5 LG4 LG3 LG2 LG1 FG22 FG19 FG18 FG17 FG14 FG13 FG11 FG9 FG8 FG6 FG3 BG23 BG22 BG16 BG13 BG10 BG3 BG53 BG50 BG49 BG47 BG46 BG44 BG42 BG40 BG39 BG38 BG36 BG35 BG34 BG33 BG32 BG30 BG29 BG28 BG27 BG26 BG25 BG24 BG21 BG20 BG19 BG18 BG17 BG15 BG14 BG11 BG9 BG8 BG7 BG6 BG5 BG4 BG2 BG1 B37
Hap_2	FG23 FG21 FG20 FG16 FG15 FG12 FG10 FG7 FG5 FG4 FG2 FG1
Hap_3	BG54 BG52 BG51 BG48 BG45 BG43 BG41
Hap_4	BG12
Hap_5	BG31

A második haplotípus (Hap\_2) kizárólag a Fertőből származó mintákból került elő, a Hap\_3, Hap\_4 és Hap\_5-ös haplotípust pedig csak balatoni minták hordozták. A balatoni gardák esetén található tehát a legtöbb haplotípus. A csak fertői mintákban előforduló Hap\_2-esen kívül mindegyik haplotípusban található balatoni minta, beleértve a két ritka Hap\_4 és Hap\_5-öt is. Mindazonáltal figyelembevéve az 54-es mintaszámot, a populáció esetén még így is egy rendkívül homogén állománynak minősül, akárcsak a Fertő a két haplotípussal, vagy a D-loop régióra nézve teljes mértékben monomorf lengyel állomány. A garda populációk alacsony diverzifikáltságát tovább erősíti, hogy a még elkülönült 5 haplotípus között is mindössze 1-1 nukleotid különbség van (19. ábra). Az egyes elkülönült haplotípusok mind a legtöbb egyed által hordozott Hap\_1-ből származtathatóak, és abból medián vektor közbeiktatása nélkül közvetlenül levezethetőek (21. ábra).

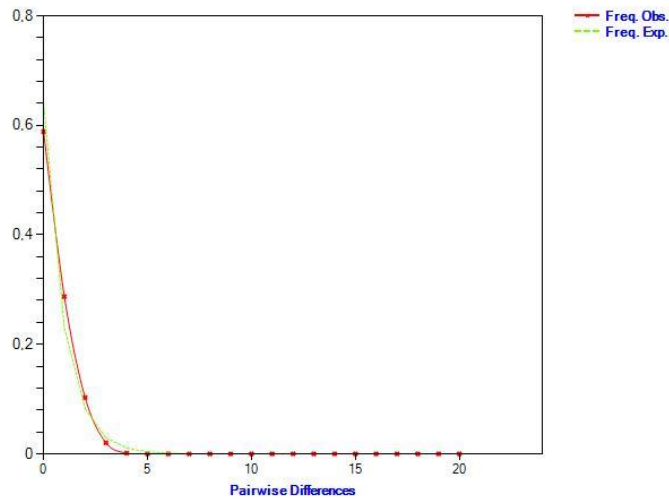


21. ábra: Garda haplotípusok hálózati ábrája Median-Joining módszerrel (PopArt szoftver), ahol a zöld a lengyel, kék a fertői, piros a balatoni populáció.

Az egyes populációk diverzitási mutatóit külön-külön is áttekintettük, bár a teljesen homogén lengyel Visztula-lagúnából származó populáció esetében a populáción belüli genetikai differenciáltsági számításoknak nincs értelme, hiszen a vizsgált szekvenciák alapján nem volt kimutatható változatosság az egyedek között. A haplotípus diverzitás ( $H_d$ ) értéke a Fertő esetén  $0,7 (\pm 0,05)$ , a Balaton esetében pedig  $0,41 (\pm 0,08)$ . Bár a fertői minták csak két haplotípust hordoznak, de azt fele akkora mintaszámból ( $N=23$ ), mint a balatoni. A Fu-féle  $F_s$  érték mutatja a legnagyobb különbségeket a két populáció esetében. Míg a Balatonnál  $-4,09$ , addig a fertői populációban pozitív értéket vett föl ( $1,28$ ). A negatív érték a Balaton esetén akár egy nemrég bekövetkező létszám növekedésre is utalhat, ez azonban a FAO által 2016-

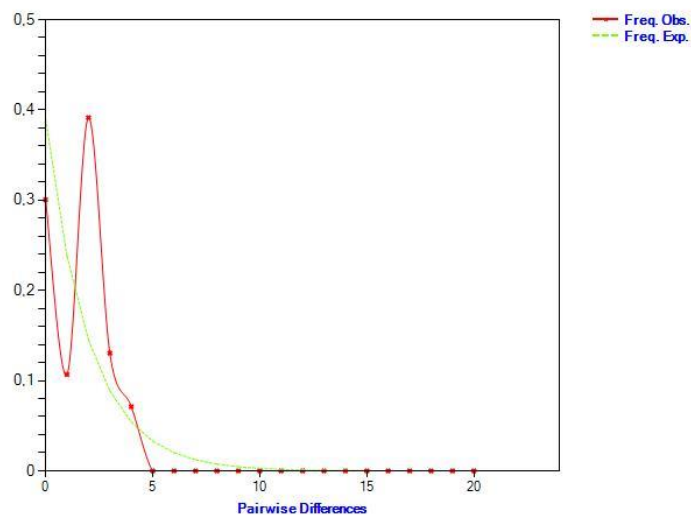


ban, a mintagyűjtés évében mért fogási adatok alapján nem támasztható alá (FAO, 2019). A hazai horgász fogási adatokban drasztikusabb változás nem történt 2013-at követően, mikor a balatoni halászat betiltásra került. A szegregációs helyek száma, és a páronkénti illesztés alapján kalkulált populáció méret változásait reprezentáló ábra (22. ábra) azonban alátámasztja a feltételezett bővülést.



22. ábra: Balatoni garda populáció feltételezett méret változásának ábrázolása, ahol a zöld a várt frekvencia a populáció növekedést feltételező null hipotézis mellett, míg a piros pontozott vonal a becslt frekvencia (DnaSP)

A balatoni populációt megfigyelve látható, hogy a várt és becslt görbe szinte teljes fedésben áll egymással. Ezzel szemben a fertői populáció a várttól eltérő, kiugró értéket mutat (23. ábra).

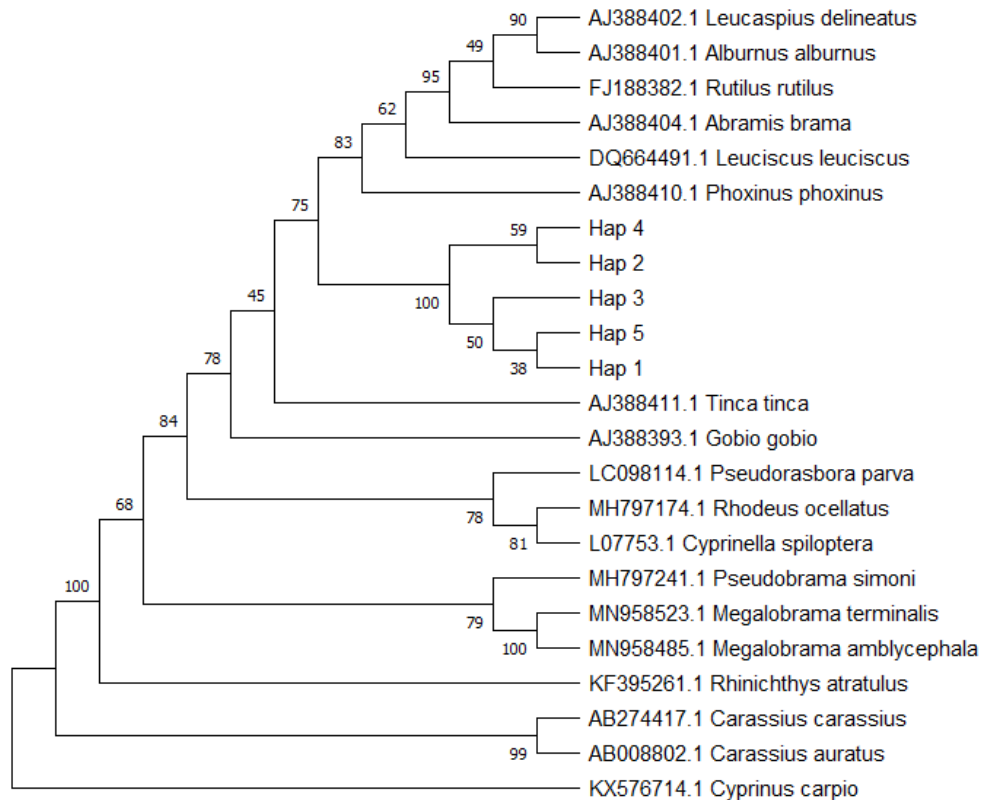


23. ábra: Fertői garda populáció feltételezett méret változásának ábrázolása, ahol a zöld a várt frekvencia a populáció növekedést feltételező null hipotézis mellett, míg a piros pontozott vonal a becslt frekvencia (DnaSP)

A Fu-féle Fs és a populációdinamikai ábra (23. ábra) alapján a Fertő esetében feltételezhető, hogy a populáció a 2017-es mintázási évet megelőzően palacknyak effektuson esett keresztül. Mivel a fertői garda populáció egy őshonos, önfenntartó populáció egy esetleges betegség vagy bármilyen külső tényező (pl. vízhiányból eredő

gyenge szaporodási sikerű évek), mely létszám csökkenéssel jár, könnyen elérheti ezt a hatást. A Tajima féle D-érték is alátámasztja ezeket a feltételezéseket, mely a Balaton esetében -1,67, míg a Fertői populációban pozitív 1,23-as értéket vett föl. A negatív érték a populációdinamikai vizsgálatoknál a mutációs ráta növekedéséből fakadhat, mely összhangban áll a pozitív Fu-féle Fs érték alapján becsült növekvő állománnyal.

A kapott 5 garda haplotípuson elvégeztem a standard nukleotid BLAST elemzést. A NCBI adatbázisával történő egyeztetés a vártnak megfelelő eredményt hozott. Mind az 5 haplotípus az adatbázisban található egyetlen garda szekvenciával (AB239597.1, Saitho et al., 2006) mutatta a legnagyobb átfedést, ezt követően többnyire a *Leuciscus* nem tagjait hozta ki az elemzés, mint a hazánkban is előforduló nyúldomolykó (*Leuciscus leuciscus*), vagy a francia vizekre jellemző *Leuciscus burdigalensis*. Ahogy azt az irodalmi áttekintésben említettem az évek során a pontyfélék családjával kapcsolatban is, mint a legnagyobb édesvízi halcsalád (Nelson, 1994), felmerültek taxonómiai kérdések és rendszertani javaslatok, melyek a gardát és domolykókat is magába foglaló *Leuciscinae* alcsaládot is érintették (Winfeld & Nelson, 1991; Briolay et al., 1998; Gilles et al., 2001; Cunha et al., 2012). Az évek során vizsgált kérdéses alcsaládok és genuszok egyes reprezentatív szekvenciáit (Melléklet 10.) az NCBI adatbázisából közösen is ábrázoltuk az általunk kapott garda haplotípusokkal (24. ábra) a ponty (KX576714.1- *Cyprinus carpio*) szekvenciát kijelölve a fa gyökereként. Az ábrán a korábbi taxonómiai besorolásuknak megfelelően a garda szekvenciák a nyúldomolykóval és a fürge csellével (*Phoxinus phoxinus*) mutatták a legszorosabb kapcsolatot. Az 5 haplotípus egy csoportot alkotott a törzsfán 2 kisebb ágra osztva, fentebb a 4-es és 2-es haplotípusok, alatta pedig a leggyakoribb 1-es, 3-as és 5-ös haplotípus. A garda haplotípusok fölött helyezkedik el a törzsfán a *Leuciscinae* család több, a hazai vizekben megtalálható tagja is, mint a bodorka (*Rutilus rutilus*), a dévérkeszeg (*Abramis brama*) és a kurta baing (*Leucaspius delineatus*). Szintén ehhez a csoporthoz, sőt a kurta bainghoz legközelebb sorolódott a szélhajtó küsz (*Alburnus alburnus*) is, ami azonban nem tagja a *Leuciscinae* alcsaládnak bár a korábban említett szakirodalmi felsorolásokban a vitatott helyzetű alcsaládok között szerepel, a compót (*Tinca tinca*) is tartalmazó *Tincinae* mellett.



24. ábra: Garda haplotípusok elhelyezkedése a Cyprinidae család filogenetikai fáján (A filogenetikai fa Neighbour Joining illesztéssel, a Kimura 2-paraméteres genetikai távolságfigyelembe véve 1000-es bootstrap értéket használva készült a MEGA-X szoftverrel)

A rokon fajokból adaptált mikroszatellit markerek estén populációgenetikai vizsgálatokat nem tudtam végezni, mert a 7 markerből, amit sikerült adaptálni csupán az Albi 61 bizonyult gyengén polimorfoknak, de önmagában egy marker nem elegendő a diverzitás mérésére. Az Albi 61 három allél mérete: 111 és 115 és 121 bp. A rokon fajok között tehát nem lehetetlen a marker adaptáció, de itt is látható, ami a kősüllő esetén is bizonyított, hogy a más fajok esetében polimorf markerek nem feltétlenül polimorfak a vizsgálandó fajnál. Összefoglalva tehát a garda populációk elemzését, a 3 populációból, összesen 125 hal mitokondriális genomjának kontroll régiója alapján 5 haplotípust különítettem el. A minták több mint 80%-a a leggyakoribb 1-es csoportba tartozott. A 3 mintavételi hely közül a lengyel Visztula-lagúnából származó minták genetikailag teljesen monomorfok voltak, beleolvadva a leggyakoribb 1-es haplotípusba (Hap\_1). A jelentős földrajzi távolság ellenére sem alkottak a magyar populációktól elkülönült egységet. A balatoni garda minták mutatkoztak a legváltozatosabbnak. Összesen 4 haplotípus volt jelen, melyek közül 3-at csak a Balatonban találtunk meg, de a minták nagy része itt is az 1-es csoportra jellemző szekvencia változatot hordozza. A Fertőből származó populáció 2 haplotípust hordoz, ebből egy csak erre a csoportra jellemző. A diverzifikáltsági mutatók ebben a csoportban a legmagasabbak, mert bár csak 2 változata található meg benne a kontroll régióknak, de az a kettő jóval kevesebb ( $n=23$ ) minta esetén, mint a balatoni mintáknál ( $n=53$ ). A csoportok közötti egyes szekvencia változatok csak 1-1 nukleotidban különböznek a leggyakoribb 1-es haplotípustól és abból mindegyik közvetlenül levezethető. A garda populációkat jellemző alacsony diverzifikáltság mellett pozitív jelnek tekinthető a balatoni mutatók alapján feltételezett növekvő egyedszám.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

### 5.1. Marker adaptálhatóság rokon fajok között

A kősüllő (*Sander volgensis*) esetén a marker adaptáció összességében sikeresnek bizonyult. A kiválasztott 13 süllő mikroszatellitből mindössze 2 marker (MS 423, MS 424) volt, melyekkel a protokollok többszöri változtatása után sem sikerült a PCR során terméket felszaporítani. Hat marker (MS 420, MS 417, MS 192, MS 384, MS 373, MS 703), melyek a süllő fajban polimorfnak bizonyultak (Kánainé et al., 2019a), a kősüllő esetén monomorfnak mutatkoztak, vagy csupán 2 allélt hordoztak, így nem alkalmazhatóak a fajban populációk diverzitásának mérésére. A PIC értékek alapján az 5 kellő mértékben polimorf marker (MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSI-1) mindegyike alkalmasnak bizonyult a magyar kősüllő populációk vizsgálatához. Az eredmények alapján azonban elmondható, hogy a különböző fajok közötti marker adaptációkor nemcsak a polimorfítás mértéke különbözhet, de az egyes mikroszatellit markerekkel detektált allélméretetek is. Jelen vizsgálat alapján a kősüllő mindegyik marker esetén nagyobb allélméret tartománnyal rendelkezett, mint a süllő, leszámítva az MS 395-ös markert, ahol a tartományok közel azonosak voltak, a kősüllő esetén 241-271 bázisig terjedtek az allélméretetek, míg a Kánainé-féle süllőkutatásban 234-270 bp volt a tartomány. A mikroszatellit markerek adaptálása tehát egy működő eljárás a sügérfélék között, de az eltérő mérettartományok miatt komplett, a süllő esetében működő multiplex marker szettek (Kánainé et al., 2009a) nem emelhetőek át.

A garda (*Pelecus cultratus*) esetében a marker adaptáció nehezebb volt, hiszen nincs olyan közeli rokona, mint a kősüllőnek a fogassüllő, mivel a garda a *Pelecus* nemzetség egyetlen tagja. Szakirodalmi adatok alapján 11 markert került kiválasztásra 5 közel rokon, a pontyfélék családjába tartozó fajtól, melyek a sujtásos küsz (*Alburnoides bipunctatus*), bodorka (*Rutilus rutilus*), ponty (*Cyprinus carpio*), fenékjáró küllő (*Gobio gobio*) és a vaskos csabak (*Leuciscus souffia*) voltak. A 11 kiválasztott markerből 6 marker esetén sikerült PCR terméket amplifikálni, ami bár picit több, mint 50%, de messze elmarad a kősüllőnél mért eredményességtől. A közelebbi rokon fajoktól, mint a bodorka, vagy a sujtásos küsz, több markert sikerült működésbe hozni (Gob28, Albi61), mint például a pontynál leírt markerek esetén (MFW1, MFW9, MFW19). A többség azonban ezek közül is monomorf volt. Itt is bebizonyosodott tehát, hogy ha meg is található az azonos génszakasz a közeli rokon fajban, annak mérettartománya, illetve heterogenitása egyáltalán nem biztos, hogy azonos lesz. Egyetlen marker (Albi61) bizonyult gyengén polimorfnak, 3-féle allél mérettel. Önmagában egy marker, természetesen nem elég egy populáció jellemzésére, de a jövőben, ha sikerülne újabb markereket adaptálni, vagy könyvtár-készítéssel izolálni, már lehetőség lenne egy átfogóbb vizsgálatra. Jelen munka pedig bizonyítja, hogy az adaptáció nem lehetetlen, még olyan fajok esetében sem, melyek önálló genuszba tartoznak. Bár ennél a fajnál a markerek többsége, melyekhez sikerült működő PCR protokollt létrehozni, monomorfnak bizonyult a vizsgált állományokon, más, genetikailag változatosabb állományokon lehetnek polimorfak.

## 5.2. Kősüllő populációgenetikai vizsgálatok

Az 5 darab süllőből izolált polimorf mikroszatellit marker (MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSL-1) és a mitokondriális genom kontroll régiója (D-loop) alkalmasnak bizonyult a Balaton, a Duna és összevonva a Tisza és Holt-Körös populációiból vett minták genetikai diverzitásvizsgálatára, bár mikroszatellitek esetén érdemes lenne több markert is bevonni a későbbi vizsgálatokba, valamint a Tisza és Holt-Körös területéről több mintát begyűjteni, de ez ekkora területről nehezebb feladat. Mivel a kősüllő kiemelten kedvelt a horgászok körében, érdemes lenne a jövőben a mintázások kapcsán felvenni a kapcsolatot a környéken lévő horgász szövetségekkel. A három csoport közül a balatoni kősüllő populáció bizonyult a legegységibbnek. Mind a mikroszatellit markerek esetén kimutatható egyedi allélszám, mind a mitokondriális genom D-loop régiója alapján meghatározott haplotípusokat figyelembe véve elmondható, hogy a balatoni kősüllő populáció olyan ritka genetikai háttérrel rendelkező egyedeket tartalmaz, mely alapján a populáció értékes genetikai erőforrás lehet az esetlegesen beszűkült genetikai háttérrel rendelkező kisebb állományok vérfrissítéséhez, illetve új állományok létrehozásához. Míg ezek a beavatkozások könnyebben kivitelezhetőek egy kisebb és zárt, beltenyésztett populáció esetében, a Duna esetében hosszú távon lehet beszélni az állomány „feljavításáról”, amire a mitokondriális genom vizsgálatok alapján szükség lehet, tekintve az alacsony számú (N=3) haplotípust, amit a populáció hordoz. Az összesen 7 haplotípus, amit a 118 egyed alapján sikerült kimutatni, meglehetősen kevésnek mondható. Az alacsony haplotípus diverzitás mellett, a nukleáris genom vizsgálata esetén is kimutatható volt a heterozigotitás csökkenése. Mindhárom populáció eltérést mutatott a Hardy-Weinberg egyensúlytól, az adatok alapján heterozigóta hiány következett. Ugyanakkor a populációk közötti genetikai távolságok a vártnál kisebbek, ám arányosak a földrajzi távolságokkal, vagyis a földrajzilag két legtávolabbi állomány között a legnagyobb a genetikai különbség. Mindez esetleg lehet horgász célú telepítések következménye, amelyet kevés, esetleg dunai, vagy balatoni eredetű tenyészállat felhasználásával végeztek. Mivel már rendelkezésünkre állnak működő markerek és protokollok, az eredmények alapján érdemes lenne egy második mintázási és vizsgálati kört tartani, több egyed és populáció bevonásával. Ez megválaszolhatná, hogy az eddigi ellenőrizetlen telepítések milyen hatással vannak a kősüllő természetes állományaira, vagy hogy a populációkat a mintavételkor jellemző diverzifikáltság tovább romlott-e, illetve (mivel a FAO adatai között jelenleg az utolsó fogási adat 2018-as), szükséges lenne ezen adatokat is frissíteni, hogy átfogóbb véleményyt lehessen mondani, a hazai állományok állapotáról.

## 5.3. Ezüstkárász populációgenetikai vizsgálatok

Az ezüstkárász (*Carassius gibelio*) esetén a mitokondriális genom kontroll régiójával (D-loop) sikeresen elvégeztük a Balaton és vízgyűjtő területeinek populációgenetikai vizsgálatát kiegészítve egy referencia-csoporttal a Hőgyészi halastavak ezüstkárász populációjával. A 22 haplotípusnak, amit a 132 egyed

vizsgálata során kaptunk több mint a fele csak 1 vagy 2 mintában volt jelen, ami a hazai állomány változatos származására utal. A kapott eredményekből kitűnik az Őszödi-berek populációjának teljes elkülönülése. Az innen mintázott halak mindössze két, a többi populációtól teljesen elkülönült haplotípust hordoznak. Az Őszödi-berek mára már nemcsak földrajzilag, de genetikailag is teljesen elszigetelt populáció. A terület korábban élő kapcsolatban állt a tóval, azonban az 1800-as évekbeli vízrendezéskor leválasztották, és azóta a víz kapcsolata a tóval egy szivattyún keresztül történik, a halállomány tehát elszigetelődött. Annak oka, hogy a szintén többi mintavételi hellyel élő kapcsolatban nem álló Hőgyész miért hordoz vegyesen többféle haplotípust, és miért nem alakult ki ott is egy, csak arra a tóra jellemző ezüstkárász állomány, nem ismert, de nagy valószínűséggel magyarázható a tavon és vízrendszerén végzett telepítésekkel. A populációkat jellemző lókuszt differenciáltsági értékek alapján (Fu-féle  $F_s$ , Tajima  $D'$ ) az Ingói az egyetlen populáció, aminek esetében bár kismértékben, de csökkenő egyedszámra lehet következtetni. Feltételezhető, hogy a Kis-Balaton Vízvédelmi Rendszer kialakítása hatással lehetett az Ingói terület ezüstkárász populációjára, és az állomány a kialakított hallépcső ellenére is csökkenésnek indult, ami kedvező az ott lévő őshonos állományokra nézve. A többitől legeltérőbb szekvenciával rendelkező egyedek a nukleotid diverzitások alapján a Siófok-Töreki populációban voltak. A Siófok-Töreki tórendszer még ma is élő összeköttetésben áll a Balatonnal így nem meglepő, hogy csak rá jellemző haplotípust mindössze egyetlen egyet tudtunk kimutatni. Ellenben ez a populáció volt az, mely rávilágít, hogy az ún. kárász komplex tagjai kapcsán a szakirodalomban fellelhető taxonómiai kérdéseknek itthon is van létjogosultsága. Erre utal a BLAST analízis eredménye, mely kimutatta a fenotípusosan egyértelműen ezüstkárász minták között jelenlévő 5 *Carassius auratus auratus* haplotípust, illetve a *Carassius auratus buergeri* haplotípust. Ha elvetjük mintáink eredete kapcsán a téves fenotipizálás lehetőségét, akkor a szekvenciák hibás kezelése, és a D-loop markerrel végzett azonosítása is félreviszheti az eredményeket. Ennek bizonyítására ellenőrzésre kerültek a detektált haplotípusok, a másik két mitokondriális genomi markerrel a Citokróm *b*-vel és a Citokróm oxidáz-1 alegységgel együtt. A Citokróm *b* szekvenciákkal végzett BLAST keresés mindegyik korábbi D-loop haplotípust *Carassius gibelio*-ként azonosította. A Citokróm oxidáz 1-es alegység gyakori marker a taxonómiai kutatásokban, szekvencia változatai alapján épült fel a BOLD rendszer. Az illesztés a BOLD rendszerben, valamint a BLAST vizsgálatok a haplotípusok egy részét szintén aranyhal eredetűnek jelezte, akár csak a D-loop. Mindez lehet az aranyhalak és az ezüstkárász közötti hibridizáció következménye, amely jelenség jól ismert (Flajshans et al., 2007; Mezhzherin et al., 2012). Mivel a mitokondriális DNS anyai öröklődés menetű, abban az esetben, ha az aranyhal (*C. a. auratus*, vagy *C. a. buergeri*) volt a nőivarú egyed a hibridizáció során, az utód generációkban a tőle származó mitokondriális genom „változatlan formában” továbbadódik, miközben a tőle származó utódok fenotípusa ezüstkárászra hasonlít. Az ilyen egyedek esetén ajánlott lenne a nukleáris DNS ilyen irányú vizsgálata is. Ugyanakkor az is feltételezhető, hogy az adatbázisokba tévesen rögzített vagy azonosított szekvencia adatok is bekerültek, ami helytelen taxonómiai azonosításhoz vezethet. Ezek alapján az ezüstkárász vizsgálatokban a kétes fenotípusú halak esetében, illetve más markerek alapján kétes eredetű szekvenciák azonosítására javasolt több marker és adatbázis használata. Ezt megerősítendő a jövőben érdemes lenne a kárász komplex minden tagjától (*Carassius carassius*, *Carassius cuvieri*, *Carassius gibelio*, *Carassius auratus grandoculis*,

*Carassius auratus auratus*) több, reprezentatív számú mintát begyűjteni és úgy is ellenőrizni.

A Citokróm *b* régió alapján készült el az a filogenetikai fa is, ahová az ezzel a markerrel kapott haplotípusokat beillesztettük más filogenetikai kutatások (Takada et al., 2010; Kalous et al., 2012) eredményei közé. Bár a hipotézis az volt, hogy az általunk azonosított 5 csoport, a Kalous-féle *Carassius gibelio* I.-es csoportba fog sorolódni a Cyt.B\_3 és a Cyt.B\_5-ös csoport a mongol eredetű *Carassius gibelio* II-es csoportba került. Ha figyelembe vesszük ezt, és a D-loop régió filogenetikai törzsfáján a haplotípusaink közé bekerült szintén Ázsiai eredetű ezüstkárász szekvenciát (AC: EF6336281), feltételezhető, hogy a hazai vizekbe az idők során onnan is érkeztek egyedek, például akvárium díszhalként, melyet aztán szabadon engedtek, akár csak az aranyhalakat. Jelen eredmények alapján nagyon valószínű, hogy a kárász komplex tagjai közötti hibridizáció lezajlott a vizsgált vízgyűjtőn, és ennek köszönhető a *Carassius auratus auratus* és a *Carassius auratus buergeri* szekvencia megjelenése a minták között.

#### 5.4 Garda populációgenetika vizsgálatok

A mitokondriális genom kontroll régiójának vizsgálata a három garda populáció esetén aggasztó eredményt hozott. Az itthon közösségi jelentőségű halfajként számoltartott őshonos garda populációi rendkívül alacsony diverzitást mutattak a mitokondriális D-loop marker alapján. A 125 egyed szekvenciái alapján azonosított, mindössze 5 haplotípus rendkívül kevés, főként ha azt is figyelembe vesszük, hogy a minták több mint 85%-a ugyanazt a variációt hordozza, és hogy a minták egy része a referenciaként bevont lengyel Visztula-lagúnai populációból származik, ami földrajzilag is meglehetősen távol van. Ennek ellenére a lengyel minták nem különültek el a magyartól, sőt egyetlen, a leggyakoribb haplotípusba sorolódtak. A lengyel garda populáció ugyanis mitokondriálisan teljesen homogén. Egy sokkal nagyobb diverzitást mutat ezen a szinten a fertői populáció, ahol az egyedek két külön haplotípust hordozó csoportba kerültek. Bár a kétféle haplotípus sem túl előnyös diverzitás szempontból, (arra utal, hogy mindössze két ősi anyai vonalról származik a teljes vizsgált állomány), különösképpen egy elszigetelt populáció esetén, de ki kell emelni, hogy ebből az egyik csoport (Hap\_2) csak a Fertőre jellemző, ezáltal igen értékes. Egy ilyen homogén genetikai háttérrel rendelkező faj esetében a genetikai diverzitás és erőforrás megőrzésének szempontjából hasonlóan értékes egyedi csoportokat hordoz a balatoni populáció is (Hap\_3, Hap\_4, Hap\_5). Az eredmények alapján bizonyítható, hogy a fajok közötti marker adaptáció a garda esetében sem lehetetlen. A jövőben érdemes lenne még több mikroszatellit markert adaptálni és egy nagyobb volumenű munka keretében további információkat gyűjteni a vizsgált populációkról. Új SNP vagy mikroszatellit markereket fejleszteni, és a garda állományok nukleáris genomját is megvizsgálni azokkal. Ha a nukleáris markerek esetén is ilyen alacsony diverzitás figyelhető meg, a faj érdekében érdemes lenne génmegőrzési lépéseket tenni. A garda, mint közösségi jelentőségű halfaj megőrzése a törvény által is kimondva az európai közösség kiemelt feladata. Ha az állomány genetikai homogenitása további alátámasztást nyer, az azt jelenti, hogy akár egyetlen ismeretlen betegség megjelenése az egész hazai állományt veszélyezteti.

## 6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Vizsgálataim alapján az új tudományos eredmények:

1. A PCR protokollok optimalizálásával 11 mikroszatellit markert (MS 420, MS 417, MS 192, MS 384, MS 373, MS 703, MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSL-1) sikeresen adaptáltam fogassüllő (*Sander lucioperca*) fajból kősüllőre (*Sander volgensis*) és egy 1 mikroszatellit markert (Albi61) sujtásos kűszből (*Alburnoides bipunctatus*) gardára (*Pelecus cultratus*).
2. Öt újonnan adaptált és polimorf mikroszatellit markerrel (MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSL-1), valamint a mitokondriális genom kontroll régiójával elvégeztem 3 magyar kősüllő állomány (Balaton, Duna, Tisza\_Holt-Körös) populációgenetika vizsgálatát. Megállapítottam, hogy a populációk eltérnek a Hardy-Weinberg egyensúlytól, és közülük a balatoni hordozza a legegységibb, ezáltal génmegőrzési szempontból a legértékesebb genetikai hátteret.
3. Három, a szakirodalomban már korábban jól jellemzett mitokondriális genetikai markerrel (Citokróm *b*, Citokróm oxidáz 1-es alegység, D-loop) elvégeztem a Balaton és vízgyűjtőterületén található 5 és egy további ezüstkárász (*Carassius gibelio*) populációjának filogenetikai analízisét. Ennek során meghatároztam a kárász komplex tagjainak taxonómiai azonosítására leginkább alkalmas markert (Cyt.B).
4. Bizonyítottam, hogy a magyarországi ezüstkárász állományban aranyhal eredetű mitokondriális genomot hordozó egyedek is megtalálhatóak.
5. A világon elsőként populációgenetikai vizsgálatot végeztem 2 magyar és 1 lengyel garda populáción. Megállapítottam, hogy mind a hazai, mind a lengyel populációk aggasztóan homogén genetikai háttérrel rendelkeznek.



## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban a biodiverzitás csökkenése, ezen belül is az egyes területeket jellemző őshonos fajok genetikai változatosságának csökkenése az egyre sürgetőbb környezetvédelmi problémák egyik kulcseleme. A génmegőrzés azonban csak akkor lehetséges, ha ismerjük a megőrzendő fajokat, illetve az azokat veszélyeztető idegenhonos invazív fajok genetikai hátterét. Ezt figyelembe véve doktori munkám során 3 halfaj, a horgászok körében kiemelten kedvelt és őshonos kősüllő (*Sander volgensis*), a közösségi jelentőségű, őshonos garda (*Pelecus cultratus*) és az idegenhonos, invazív ezüstkárász (*Carassius gibelio*) genetikai hátterének vizsgálatára alkalmas molekuláris módszerek kidolgozása és alkalmazása volt az elsődleges cél. Az őshonos populációk esetén a vizsgálatok két markertípusra, a nukleáris genomon található mikroszatellit markerekre és mitokondriális genom kontroll régiójára fókuszáltak, míg az idegenhonos ezüstkárász esetén - mivel az általános genetikai állapot mellett elsősorban a származásra voltunk kíváncsiak - a mitokondriális genom több régiója volt a vizsgálatok célpontja (D-loop, Citokróm B., Citokróm oxidáz 1.-es alegység).

A módszerfejlesztés során a kősüllő és a garda esetén is új markerek fejlesztése helyett a költséghatékonyabb, marker adaptálás történt rokon fajokból. A kősüllő esetén a vizsgálatokhoz 13 a fogassüllő fajban leírt marker (MS 420, MS 417, MS 192, MS 384, MS 373, MS 703, MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSL-1) került kiválasztásra. A garda esetén 11 mikroszatellit markert került kijelölésre a *Pelecus* genusz más tagjainak hiányában a pontyfélék családjából (*Cyprinidae*). Egy markert (Gob28) a fenékjáró küllőből (*Gobio gobio*), 3 markert (Albi61, Albi462, Albi22) a sujtásos küszből (*Alburnoides bipunctatus*), 1 egy általános marker a pontyfélék családjából (CypG24), 1 a bodorkából (*Rutilus rutilus*), 2 marker a vaskos csabakból (B11-153, B12-114) és 3 marker (MFW19, MFW1, MFW9) a pontyból került izolálásra. A protokollok optimalizálása közben elsősorban a PCR-ek során használt MgCl<sub>2</sub> mennyiséget (a primer kapcsolódást és a taq polimeráz aktivitását is befolyásolja), a primer feltapadási hőmérsékletet és a ciklusszámot került megváltoztatásra. A termékeket kapilláris gélelektroforézissel vizsgáltuk tovább, és kizártuk a további vizsgálatokból a monomorfnak bizonyult markereket. A kősüllő esetén 5 marker (MS701, MS704, MS404, MS395, MSL1) bizonyult polimorfoknak, míg a garda esetén csupán egy (Albi61). Mivel egy marker nem elegendő a vizsgálatokhoz, a garda populációk vizsgálata során nem került sor mikroszatellit elemzésre.

A kősüllőn tehát 5 mikroszatellit markerrel és a mitokondriális genom kontroll régiójával 3 populáción (Balaton, Duna, Tisza\_Holt-Körös) végeztem el a diverzitásvizsgálatokat. A mikroszatellit markerek esetén, ez az adaptálás során kidolgozott PCR protokollokkal, majd az azt követő kapilláris gélelektroforézissel, míg a mitokondriális D-loop marker esetén a PCR-t követő szekvenálással történt. Az eredményeket külön-külön értékeltük, majd összevetettük. A markerek nagyobb mintaszám (n=118) esetén alkalmasnak bizonyultak populációgenetikai vizsgálatokra. A mikroszatellit markerek, polimorf információ tartalom (PIC) értéke alapján, a rendkívül informatív kategóriába estek. A kapott heterozigotizációs mutatók alapján mindhárom populáció szignifikáns eltérést mutat a Hardy-Weinberg egyensúlytól és mérsékelt heterozigóta hiányt feltételez. Az allélfrekvenciák alapján a dunai populáció a legdiverzebb, a Balaton viszont számos egyedi allélt hordoz, mely diverzitási

szempontból értékesebbé teszi. A mitokondriális genom vizsgálat is a balatoni populációt hozta ki a legegységibbnek. A 849 bázispár hosszú szekvencia illesztése és szekvenálása után kapott 7 haplotípusból 4 csak rá volt jellemző. Összességében a vizsgált populációk az őket jellemző alacsony haplotípus szám, és a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés mellett csökkenő diverzifikáltságot mutatnak. Emiatt a jövőben javasolt lenne a bemutatott markerekkel, és esetleg továbbiakkal egy nagyobb mintaszámú, és több mintavételi területet magába foglaló vizsgálatot elvégezni.

Az invazív ezüstkárász esetén 6 mintavételi helyről (Siófok, Kisköre, Ingó, Őszödi-berek, Töreki-tavak, Hőgyész) 132 egyed vizsgálata valósult meg a mitokondriális DNS D-loop régiója alapján, majd a kapott haplotípusokat reprezentáló mintákat 2 további mitokondriális markerrel (Citokróm B, Citokróm oxidáz 1. alegység) is. A vizsgálat DNS izolálás után PCR, PCR termék tisztítás, majd szekvenálás. A PCR protokoll mindhárom marker, sőt mindhárom faj esetén megegyezett, akárcsak a szekvenálási protokollok, melyeket az anyagok és módszerek fejezetben ismertettem. 22 haplotípust határoztunk meg a D-loop régió alapján. Az Őszödi-berek nemcsak földrajzilag, de genetikailag is teljesen elkülönült állományt alkotott. A legtöbb haplotípust a Siófoknál mintázott balatoni populáció hordozta. Az eredményeket összehasonlítottuk az NCBI adatbázisával is. Hat haplotípus (HapDI\_3, HapDI\_4, HapDI\_6, HapDI\_8, HapDI\_11, HapDI\_14) nagyobb átfedést mutatott a kárász komplex más tagjaival (*Carassius auratus auratus*, *Carassius auratus buergeri*), mint az ezüstkárászsal. A haplotípusokat tovább vizsgálva a citokróm oxidáz 1 esetén 4, a citokróm *b* esetén pedig 6 haplotípust kaptunk. A külön Co.I. szekvenciákra specifikálódott adatbázissal (BOLD) összevetettük a kétes találatokat, de 2 szekvenciát még itt is *Carassius auratus auratus*-ként azonosított a rendszer. Mindez arra utal, hogy a vizsgált vízgyűjtőn az aranyhal és az ezüstkárász között intogresszív hibridizáció is lezajlott. Ugyanakkor nem zárható ki, hogy az alkalmazott adatbázisok helytelen taxonómiai besorolású adatokat is tartalmaznak. Az irodalmi áttekintés és vizsgálatunk alapján elmondható, hogy a Balaton és vízgyűjtő területének ezüstkárász populációja számos haplotípust hordoz, és ezek részben ázsiai származásúak lehetnek.

A garda esetén 3 populációt (Balaton, Fertő, Visztula-lagúna (Lengyelország)) vizsgáltam, kellő mennyiségű mikroszatellit marker hiányában csak a mitokondriális genom D-loop régiója alapján, PCR-t követő szekvenálással. A 125 egyedből 5 haplotípust volt lehetséges elkülöníteni, ami rendkívül kevés. A lengyel populáció teljesen homogén genetikai háttérrel rendelkezett a szekvenciák alapján. A Fertő mindössze 2, míg a Balaton, mely a legváltozatosabbnak bizonyult 4 haplotípust hordozott. Ezek közül 3 csak rá jellemző, melyek ritkának mondhatók, így egy génmegőrzési folyamatban szerepük felértékelődik. A jövőben érdemes lenne még több mikroszatellit markert adaptálni, vagy fejleszteni a garda vizsgálatokhoz, valamint egy nagyobb volumenű munka keretében további információt gyűjteni a garda nukleáris genomjáról és megvizsgálni, hogy az is alátámasztja-e a nagyfokú genetikai homológiát, lehetőleg minél több egyed és populáció bevonásával. Ha igen, az azt jelenti, hogy a magyar garda populáció rendkívül sérülékenyé vált.

## 8. SUMMARY

Today, the loss of biodiversity, including the decreasing genetic diversity of native species is a key element of the increasingly pressing environmental problems. However, gene conservation is only possible if we know the genetic background of the species to be conserved and the invasive non-native species which threaten them. In the course of our work, the primary goal was to develop methods suitable for the study of 3 fish species, *Sander volgensis*, *Pelecus cultratus* and *Carassius gibelio*'s genetic background. In case of the native populations, we focused on two marker types, microsatellite markers in the nuclear genome and mitochondrial genome control region, while in case of non-native fish - as we were primarily interested in the origin of the populations - we examined several regions of the mitochondrial genome (D-loop, cytochrome B., cytochrome oxidase subunit 1).

During the development of the method, we chose to adapt the marker from more cost-effective related species instead of developing new markers for the *Sander volgensis* and *Pelecus cultratus*. For *Sander volgensis* we selected to test 13 markers (MS 420, MS 417, MS 192, MS 384, MS 373, MS 703, MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSL-1) described in *Sander luciperca*. In case of the *Pelecus cultratus* 11 microsatellite markers were selected from Cyprinidae, in the absence of other members of the genus *Pelecus*. One marker (Gob28) from *Gobio gobio*, 3 markers (Albi61, Albi462, Albi22) from *Alburnoides bipunctatus*, 1 common microsatellite marker (CypG24) from the carp family, 1 from *Rutilus rutilus*, 2 markers (B11-153, B12-114) were isolated from *Leuciscus souffia* and 3 markers (MFW1, MFW9, MFW19) from *Cyprinus carpio*. During the optimization of the protocols, we mainly changed the amount of MgCl<sub>2</sub> used in the PCR reactions, which also affects the primary binding and the activity of taq polymerase and the primary adhesion temperatures and also the number of cycles. The products were further examined by capillary electrophoresis and markers that proved to be monomorphic were excluded from further studies. In the case of *Sander volgensis* 5 markers (MS 701, MS7 04, MS 404, MS 395, MSL-1) proved to be sufficiently polymorphic, while in the case of *Pelecus cultratus* only one (Albi61). As one marker is not sufficient for the studies, no microsatellite analysis was performed in the study of *Pelecus cultratus* populations.

Diversity studies were performed on *Sander volgensis* with 5 microsatellite markers and the control region of the mitochondrial genome in 3 populations (Lake Balaton, Danube, Tisza\_Holt-Körös). In case of microsatellite markers, this was done by PCR protocols developed during the adaptation followed by capillary electrophoresis, while in case of the mitochondrial D-loop marker, this was done by sequencing after PCR. The results were evaluated separately and then compared. The markers proved to be suitable for population genetic studies with a larger number of samples (n: 118). Based on the polymorphic information content value (PIC) of the microsatellite markers, each marker fell into the highly informative category. Based on the heterozygosity indices we obtained, all three populations show a slightly significant (\*) deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium with moderate heterozygous deficit. Based on the allele frequencies, the Danube population resulted to be the most diverse, while Lake Balaton carries many unique alleles, which makes it more valuable in terms of diversity. The mitochondrial genome study also found the Balaton population to be the most unique. Of the 7 haplotypes obtained after 849 bp long sequence alignment and sequencing, 4

were unique. Overall, the populations studied took a negative direction for diversification in terms of their low haplotype number and deviation from HWE. Therefore, in the future, it would be advisable to perform a study with a larger number of samples and more sampling areas with the markers presented here and possibly further ones.

In the case of *Carassius gibelio*, 132 individuals from 6 sampling sites (Siófok, Kisköre, Ingó, Ószödi-berek, Töreki-lakes, Hógyész) were examined based on the mitochondrial D-loop region, and then the samples representing the obtained haplotypes were examined with 2 additional mitochondrial markers (Cytochrome B, oxidase subunit 1). The assay DNA was isolated, then PCR, PCR purification, and then sequencing. The PCR protocol was the same for all the three markers and even for all the three species and the sequencing protocols too, described in the Material and Methodology section. 22 haplotypes were determined based on the D-loop region. Ószödi-berek formed a completely separate group, not only geographically but also genetically. Most of the haplotypes were carried by the population fished at Siófok. The results were also compared with the NCBI database. Six haplotypes (HapDI\_3, HapDI\_4, HapDI\_6, HapDI\_8, HapDI\_11, HapDI\_14) showed greater overlap with other members of the crucian complex (*Carassius auratus auratus*, *carassius auratus buergeri*) than with *Carassius gibelio*. Further examination of the haplotypes revealed 4 haplotype groups for cytochrome oxidase 1 and 6 for cytochrome *b*. We compared the dubious results with a database specified for Co. I. sequences (BOLD), but even here 2 sequences were identified as *Carassius auratus auratus*. Cytochrome *b* appeared to be the most reliable, designating each sequence as *Carassius gibelio* based on NCBI BLAST alignment. This marker is recommended for taxonomic confirmation of the *Carassius auratus* complex. Based on our literature review, it can be said that the silver carp population of Lake Balaton and its catchment areas carries a number of haplotypes and these may be part of Asian origin.

In the case of garra, 3 populations (Lake Balaton, Fertő, Vistula Lagoon (Poland)) were examined, in the absence of a sufficient amount of microsatellite markers only on the basis of the D-loop region of the mitochondrial genome, by sequencing after PCR. We were able to isolate 5 haplotypes from 125 individuals, which is an extremely small amount. The Polish population had a completely homogeneous genetic background based on the sequence. Fertő proved to be only 2, while Balaton proved to be the most diverse with 4 haplotypes. 3 of these are unique to them, which are rare, so their role in a gene conservation process is enhanced. In the future, it would be worthwhile to adapt even more microsatellite markers to *Pelecus cultratus* studies, as well as to gather more information about the garra nuclear genome in a larger-scale work and to examine whether it also supports a high degree of genetic homology by involving as many individuals as possible. If so, it means that the Hungarian *Pelecus cultratus* population has become extremely vulnerable.

## 9. MELLÉKLET

### Melléklet 1. Irodalomjegyzék

1995. évi LXXXI. Törvény a Biológiai Sokféleség Egyezmény kihirdetéséről
- 27/2015. (VI. 17.) Országgyűlési határozata a 2015–2020 közötti időszakra szóló Nemzeti Környezetvédelmi Programról. Magyar Közlöny, 2015 évi 83. szám, 286 p.
- 275/2004. (X. 8.) Kormány rendelet az európai közösségi jelentőségű természetvédelmi rendeltetésű területekről. Magyar közlöny, 2004 évi 143. szám., 11756. p.
- Adalberto T. C., Wellington M., Guang R., G. (2002): TROLL—Tandem Repeat Occurrence Locator, *Bioinformatics*, 18(4), 634–636 p.
- Agdamar S., Tarkan S. A. (2019): High genetic diversity in an invasive freshwater fish species, *Carassius gibelio*, suggests establishment success at the frontier between native and invasive ranges, *Zoologischer Anzeiger*, 283: 192-200. p.
- Agrárminisztérium (2020): Természetvédelmi adatok, 2019. Agrárminisztérium Természetvédelemért Felelős Helyettes Államtitkárság. [http://www.termeszvedelem.hu/\\_user/browser/File/Tenyek&Adatok/Termeszvedelmi\\_adatok-20191231.pdf](http://www.termeszvedelem.hu/_user/browser/File/Tenyek&Adatok/Termeszvedelmi_adatok-20191231.pdf) Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: *természetvédelmi adatok, 2019, védett*
- Albalat R., Canestro C. (2016): Evolution by gene loss, *Genetics*, 17: 379-391. p.
- Ali B. A., Huang T. H., Qin, D. N., Wang, X. M. (2004): A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14: 443-453. p.
- Allendorf F. W., Thorgaard G. H. (1984): Tetraploidy and the evolution of Salmonid Fishes. p:45. In: *Evolutionary Genetics of Fishes*. New York: Plenum Press.
- Altschul F. S., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990): Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410. p.
- Anderson S., Bankier A. T., Barell B. G., Brujin de M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R., Young I. G. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290: 457-465. p.
- Ankel-Simons F., Cummins J. M. (1996): Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 13859-13863. p.
- Apalikova O. V., Podlesnykh A. V., Kukhlevsky A. D., Guohua S., Brykov V. A. (2011): Phylogenetic Relationships of Silver Crucian Carp *Carassius auratus*

*gibelio*, *C. auratus cuvieri*, Crucian Carp *Carassius carassius*, and Common Carp *Cyprinus carpio* As Inferred from Mitochondrial DNA Variation, *Russian Journal of Genetics*, 47(3): 322-331. p.

- Avise J. C., Helfman G. S., Saunders N. C., Hales L. S. (1986): Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83: 4350-4354 p.
- Baerwald M. R., May B. (2004): Characterization of microsatellite loci for five members of the minnow family Cyprinidae found in the Sacramento - San Joaquin Delta and its tributaries, *Molecular Ecology Notes*, 4: 385-390 p.
- Balitzki-Korte B., Anslinger K., Bartsch C., Rolf B. (2005): Species identification by means of pyrosequencing the mitochondrial 12S rRNA gene, *International Journal of Legal Medicine*, 119: 291-294 p.
- Ballard O. J. W., Whitlock M. C. (2004): The incomplete natural history of mitochondria, *Molecular Ecology*, 13(4): 729-744 p.
- Ballard O. J. W., Pichaud N. (2014): Mitochondrial DNA: more than an evolutionary bystander, *Functional Ecology*, 28: 218-231 p.
- Banaduc D, Rey S., Trichkova T., Lenhardt M., Curtean-Banaduc A. (2016): The Lower Danube Delta-North West Black Sea: A pivotal area of major interest for the past, present and future of its fish fauna – A short review, *Science of the Total Environment*, 545-546: 137-151 p.
- Bandelt H-J., Forster P., Röhl A. (1999): Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies, *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48 p.
- Baner J., Isaksson A., Waldenström E., Jarvius J., Landegren U., Nilsson M. (2003): Paralell gene analysis with allele-specific padlock probes and tag microarrays, *Nucleic Acids Research*, 31(17): 103e-103
- Bardacki F., Skibinski D. O. F. (1994): Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification, *Heredity*, 73: 117-123
- Barinova A., Yadrenkina E., Nakajima M., Taniguchi N. (2004): Identification and characterization of microsatellite DNA markers developed in the *Leuciscus idus* and Siberian roach *Rutilus rutilus*, *Molecular Ecology Notes*, 4: 86-88 p.
- Barmintseva A. E., Shalgimbayeva G. M., Koishybayeva S. K., Sarbarkanov Sh. T., Asylbekova S. Z., Isbekov K. B., Muge 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*, 7: 749-756 p.
- Bárfai R., Egedi S., Yue G. H., Kovacs B., Urbanyi B., Tamas G., Horvath L., Orban L. (2003): Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers, *Aquaculture*, 219(1-4): 157-167 p.
- Benson G. (1999): Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic acids research*, 27(2), 573–580 p.

- Berinke L. (1958): The osteology of *Lucioperca lucioperca* and *Lucioperca volgensis*, *Annales historico-naturales Musei nationalis hungarici* 50(9): 313-329 pp.
- Bernatchez L., Guyomard R., Bonhomme F. (1992): DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations, *Molecular Ecology*, 1:161-163 p.
- Bernatchez L., Danzmann R. G. (1993): Congruence in Control-Region Sequence and Restriction-Site Variation in Mitochondrial DNA of Brook Charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchili), *Molecular Biology and Evolution*, 10 (5): 1002-1014 p.
- Billington N., Hebert P. D. N. (1991): Mitochondria DNA Diversity in Fishes and its Implications for Introductions, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 80-94 p.
- Black W. C., Gorrochotegui-Escalante N., Dutea N. M. (2006): Heated Oligonucleotide Ligation Assay (HOLA): An Affordable Single Nucleotide Polymorphism Assay, *Journal of Medical Entomology*, 43(2): 238-247 p.
- Bolnick D. I., Amarasekare P., Araujo M. S., Bürger R., Levine J. M., Novak M., Rudolf V. H. W., Schreiber S. J., Urban M. C., Vasseur D. A. (2011): Why intraspecific trait variation matters in community ecology, *Trends in Ecology and Evolution*, 26(4): 183-192 p.
- Bottero, M., Civera, T., Nucera, D. et al. Design of Universal Primers for the Detection of Animal Tissues in Feedstuff. (2003), *Vet Res Commun* 27, 667–669 p.
- Bonin A., Bellemain E., Eidesen P. B., Pompanon F., Brochmann C., Taberlet P. (2004): How to track and assess genotyping errors in population genetics studies, *Molecular Ecology*, 13: 3261-3273 p.
- Boore J. L. (1999): Survey and summary, Animal mitochondrial genomes, *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767-1780 p.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. (1980): Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphism, *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331 p.
- Bridge D, Clifford W. C., Schierwater B., DeSalle R., Buss W. L. (1992): Class-level Relationships in the Phylum Cnidaria: Evidence from Mitochondrial Genome Structure, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 8750-8753 p.
- Briolay J., Galtier N., Brito R. M., Bouvet Y. (1998): Molecular Phylogeny of Cyprinids: Implications for their systematics, reticulate evolution, and colonization time, *Molecular phylogenetics and evolution*, 10(1): 132-143 p.
- Broughton R. E., Dowling T. E. (1994). Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spiloptera*, *Genetics*, 138(1), 179–190 p.
- Brown W. M, George M., Wilson A. C. (1974): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76:1967-1971 p.

- Buhay J. E. (2009): „COI-like” sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies, *Journal of molecular evolution*, 63:826-841
- Burger G., Gray M. W., Lang B. F. (2003): Mitochondrial genomes: anything goes, *Trends in genetics*, 19(12): 709-716 p.
- Chambers G. K., MacAvoy W. K. (2000): Microsatellites: consensus and controversy, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126 (2000) 455–476 p.
- Chang Y., Huang F., Lo T. (1994): The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome, *Journal of Molecular Evolution*, 38:138-155 p.
- Chapman J. R., Nagakawa S., Coltman D. W., Slate J., Sheldon B. C. (2009): A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations, *Molecular Ecology*, 18:2746-2765 p.
- Chistiakov D. A., Hellemans B., 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 p.
- Christensen M., Sunde L., Bolund L., Orntoft T, F., (1999): Comparison of three methods of microsatellite detection, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 59:167-178
- Clement M., Snell Q., Walker P., Posada D., Crandall K. (2002). TCS: Estimating gene genealogies, *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*, 2:184.
- Coburn M. M., Cavender T. M. (1992): Interrelationships of North American cyprinid fishes, *Stanford Unit Press*, 328-373 p.
- Costedoat C., Chappaz R., Barascud B., Guillard O., Gilles A. (2006): Heterogeneous colonization pattern of European Cyprinids, as highlighted by the dace complex (Teleostei: Cyprinidae), *Molecular phylogenetics and evolution*, 41(1): 127–148.
- Crooijmans R. P. M. A., Bierbooms V. A. F., Komen J., Van der Poel J. J., Groenen M. M. (1997): Microsatellite markers in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Animal genetics*, 28:129-134 p.
- Cunha C., Mesquita N., Dowling T. E., Gilles A., Coelho M. M. (2012): Phylogenetic relationships of Eurasian and American cyprinids using cytochrome b sequences, *Journal of Fish Biology*, 61:929-944
- Currie-Fraser, E., Shah, P., True, S. (2010): Data analysis using GeneMapper® v4.1: Comparing the Newest Generation of GeneMapper Software to Legacy Genescan® and Genotyper® Software. *Journal of Biomolecular Techniques*, JBT, 21(3 Suppl), S31.



- Deagle B. E., Jarman S. N., Coissac E., Pompanon F., Taberlet P. (2014): DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match, *Biology letters*, 10:20140562.
- DeWoody, J. & Avise, J.C.. (2005). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*. 56. 461 – 473 p.
- Doszpoly A., Papp M., Deákné P. P., Glávits R., Ursu K., Dán Á. (2015): Molecular detection of a putatively novel cyprinid herpesvirus in sichel (*Pelecus cultratus*) during a mass mortality event in Hungary, *Archives of Virology*, 160:237-248 p.
- Earl D. A., VonHoldt B. M. (2012): STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method, *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361 p.
- Ellegren H. (2004): Microsatellites: Simple sequences with complex evolution, *Genetics*, 5:435-445 p.
- Estoup A., Presa P., Krieg F., Vaiman D., Guyomard R. (1993): (CT) and (GT) microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L (Brown trout), *Heredity*, 71: 488-496 p.
- Estoup A., Rousset F., Michalakis Y., Cornuet J. M., Adriamanga M., Guyomard R. (1998): Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*), *Molecular Ecology*, 7: 339-353 p.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study, *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620 p.
- Faber J. E., Stepien C. A. (1998): Tandemly repeated sequences in the mitochondrial DNA control region and phylogeography of the Pike-Perches Stizostedion, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10(3): 310-322 p.
- FAO (2019): The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture, J. Bélanger & D. Pilling (eds.). FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome. 572 pp.
- Flajshans M., Rodina M., Halacka K., Vetesnik L., Papousek I., Gela D., Lusková V., Lusk S. (2007): Ploidy levels and reproductive patterns of *Carassius auratus gibelio* as revealed by means of artificial hybridization and flow cytometry, *Aquaculture*, 272(sup.1.): S238-S321p.
- Freamo H., O'Reilly P., Berg P. R., Lien S., Boulding E. G. (2011): Outlier SNPs show more genetic structure between two Bay of Fundy metapopulations of Atlantic salmon than do neutral SNPs, *Molecular Ecology Resources*, 272:156-164 p.
- Fu Y. X. (1997): Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915–925 p.
- Gabriel S., Ziaugra L. (2004): SNP Genotyping using Sequenom MassARRAY 7K Platform, *Current Protocols in Human Genetics*, 2.12.1-2.12.16

- Gemayel R., Vences M. D., Legendre M., Verstrepen K. J. (2010): Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences, *Annual Review of Genetics*, 44: 445-477 p.
- Gilles A., Lecointre G., Miquelis A., Loerstcher M., Chappaz R., Brun G. (2001): Partial combination applied to phylogeny of European cyprinids using the mitochondrial control region, *Molecular phylogenetics and evolution*, 19(1): 22–33 p.
- Green E. K. (1998): Restriction Fragment-Length Polymorphisms. In: *Molecular Biomethods Handbook*. Humana Press, 271-279 p.
- Hallerman E. M., Beckmann J. S. (1988): DNA-level polymorphism as a tool in Fisheries Science, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 45:1075-1087 p.
- Hansen M. M., Hynes R. A., Loeschcke V, Rasmussens G. (1995): Assessment of the stocked or wild origin of anadromous brown trout (*Salmo trutta* L.) in a Danish river system, using mitochondrial DNA RFLP analysis, *Molecular ecology*, 4:189-198 p.
- Hansen M. M., Kenchington E., Nielsen E. E. (2001): Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers, *Fish and Fisheries*, 2:93-112 p.
- Hardy G. H. (2003). Mendelian proportions in a mixed population. 1908, *The Yale journal of biology and medicine*, 76(2): 79–80.
- Harris J. A. (1918): The Variable Desert, *American Association for the Advancement of Science, The Scientific Monthly*, 3(1): 41-50 pp.
- Hecker K. H., Taylor P. D., Gjerde D. T. (1999): Mutation detection by denaturing DNA chromatography using fluorescently labeled polymerase chain reaction products, *Analytical biochemistry*, 272:156-164 p.
- Heller R., Siegismund H. R. (2008): Relationship between three measures of genetic differentiation GST, DEST, G'ST: how wrong have we been? *Molecular Ecology*, 18:2080-2083 p.
- Herbert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., deWaard J. R. (2003): Biological identification through DNA barcodes, *The Royal Society*, 270:313-321 p.
- Herman O. (1887): A magyar halászat könyve. Budapest: Homonnai és társa könyvkiadó, 434-439 p.
- Higgins D. G., Sharp P. M. (1988): CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer, *Gene*, 73(1): 237-244 p.
- Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16): 7276-7280 p.
- Hosseinnia Z., Shabany A., Kolangi-Miandare H. (2014): Comparison of genetic variation of wild and farmed Bream (*Abramis brama orientalis*; berg, 1905)

- using microsatellite marker, *Molecular Biology Research Communications*, 3(3): 187-195 p.
- Hunter R. L., Market C. L. (1957): Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels, *Science*, (125): 1294-1295. p.
- Hutchison C. A., Newbold J. E., Potter S. S., Edgell M. H. (1974): Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA, *Nature*, 251: 536-539 p.
- Hsu T. M., Chen X., Duan S., Miller R. D., Kwok P.-Y. (2001): Universal SNP Genotyping Assay with Fluorescence Polarization Detection, *BioTechniques*, 31:560-570 p.
- Hu X, Ma B, Li C, Jia Z, Jiang X, Ge Y, Tong J, Shi L. (2020): Genetic Differentiation of an Endangered *Megalobrama terminalis* Population in the Heilong River within the Genus *Megalobrama*, *Diversity*, 12(10):404 p.
- Ibrokhim Y. A. (2016): Microsatellite markers, *InTechOpen*, 250 p.
- Imsiridou A., Apostolidis A. P., Durand J-D., Briolay J., Bouvet Y., Triantaphyllidis C. (1998): Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek Chub, *Leuciscus cephalus* L. (Pisces, Cyprinidae) populations as revealed by RFLP analysis of mitochondrial DNA, *Biochemical Systematics and Ecology*, 26: 415-429 p.
- IUCN (2021): The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-1. <https://www.iucnredlist.org>. Downloaded on [2021. 03. 29].
- Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H., Hebert, P. D. N. (2007): Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7: 544-548 p.
- Jakovlic I., Gui J-F. (2011): Recent invasion and low level of divergence between diploid and triploid forms of *Carassius auratus complex* in Croatia, *Genetica*, 139: 789-804 p.
- Jameson D. M., Ross J. A. (2010): Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging, *Chemical Reviews*, 110 (5): 2685-2708 p.
- Janson S., Wouters J., Bonow M., Svanber I., Olsen K. H. (2015): Population genetic structure of crucian carp (*Carassius carassius*) in man-made ponds and wild populations in Sweden, *Aquaculture International*, 23: 359–368 p.
- Japoshvili B., Mumladze L., Küçük F. (2013): Invasive *Carassius* carp in Georgia: Current state of knowledge and future perspective, *Current Zoology*, 59(6):732-739 p.
- Johnson, M. P., Haupt, L. M., & Griffiths, L. R. (2004). Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR. *Nucleic acids research*, 32(6), 55 p.
- Jombart T. (2008): “ade4: a R package for the multivariate analysis of genetic markers, *Bioinformatics*, 24: 1403-1405 p.
- Jost L. (2008): GST and its relatives do not measure differentiation, *Molecular Ecology*, 17:4015-4026 p.

- Jung J., Song K. H., Lee E., Kim W. (2009): Mitochondrial genetic variations in fishes of the genus *Carassius* from South Korea: proximity to northern China rather than Japanese Islands? *Hydrobiologia*, 635:95-105 p.
- Kalous L., Slechtová Jr. V., Bohlen J., Petrtyl M., Svátora M. (2007): First European record of *Carassius langsdorfii* from the Elbe basin, *Journal of Fish Biology*, 70:132-138 p.
- Kalous L., Bohlen J., Rylková K., Petrtyl M. (2012): Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for *Carassius gibelio* (Teleostei: Cyprinidae), *Ichthyological Exploration of Freshwater*, 23:11-18 p.
- Kayal E., Bentlage B., Collins A. G., Kayal M., Pirro S., Lavrov D. V. (2011): Evolution of Linear Mitochondrial Genomes in Medusozoan Cnidarians, *Genome Biology and Evolution*, 4(1): 1-12 p.
- Kayser M., Vowles E. J., Kappei D., Amos W. (2006): Microsatellite length differences between humans and chimpanzees at autosomal Loci are not found at equivalent haploid Y chromosomal Loci, *Genetics*. 173 (4): 2179-2186 p.
- Kánainé S. D., Kovács Gy., Buza E., Csenki-Bakos K., Ósz Á., Ljubobratovic U., Cservedi-Szűcs R., Bercsényi M., Lehoczky I., Urbányi B., Kovács B. (2019a): Comparative genetic analysis of natural and farmed populations of pike-perch (*Sander lucioperca*), *Aquaculture International*, 27:991-1007 p.
- Kánainé S. D., Bakos K., Ósz Á., Hegyi Á., Müller T., Urbányi B., Kovács B. (2019b): Development and characterization of 49 novel microsatellite markers in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), *Molecular Biology Reports*, 19:4852-4862 p.
- Kapli P., Yang Z., Telford M. J. (2020): Phylogenetic tree building in the genomic age, *Nature Reviews Genetics*, 21:428-444 p.
- Kimura M. (1968): Evolutionary Rate at the Molecular Level, *Nature*, (217):624-626 p.
- Kirk H., Freeland J. R. (2011): Applications and Implications of Neutral versus Non-neutral Markers in Molecular Ecology, *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 3966-3988 p.
- Kohlmann K., Kersten K. (2008): Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the pike-perch, *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758), *Molecular Ecology Resources*, 8:1085-1087 p.
- Kohlmann K., Kersten K. (2013): Deeper insight into the origin and spread of European common carp (*Cyprinus carpio carpio*) based on mitochondrial D-loop sequence polymorphisms, *Aquaculture*, 376-379:97-104 p.
- Kolics B., Kovács B., Taller J., Várkonyi L., Horváth L., Kucharczyk D., Müller T. (2015): Identification of European eel juvenile by using PCR-RFLP, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 137: 411-414 p.
- Komen H., Thorgaard G. H. (2007): Androgenesis, gynogenesis and the production of clones in fishes: A review, *Aquaculture*, 269: 150-173 p.

- Komiyama T., Kobayashi H., Tateno Y., Inoko H., Gojobori T., Ikeo K. (2009): An evolutionary origin and selection process of goldfish, *Gene*, 430: 5-11 p.
- Korponai J., Varga K. A., Lengré T., Papp I., Tóth A., Braun M. (2011): Paleolimnological reconstruction of the trophic state in Lake Balaton (Hungary) using Cladocera remains, *Hydrobiologia*, 676:237-248 p.
- Kraczkowski M.L., Chernoff B. (2014). Molecular Phylogenetics of the Eastern and Western Blacknose Dace, *Rhinichthys atratulus* and *R. obtusus* (Teleostei: Cyprinidae), *Copeia*, 2014(2): 325-338 p.
- Kucuktas H., Liu Z. (2007): Allozyme and Mitochondrial DNA Markers. In: Aquaculture Genome Technologies (Chapter 7), *Blackwell publishing*, 73-85 p.
- Kujawa R., Pol P., Mamcarz A., Furgala-Selezniow G. (2011): Preliminary studies on fishing and transport of the sichel (*Pelecus cultratus* L. 1758) for reproduction under controlled conditions. In: Fish management in a variable water environment. Olsztyn. Publishing: Agencja Wydawnicza „Argi” SC R. Błaszak, P. Pacholec, J. Prorok. 201-205 p.
- Kujawa R., Kucharczyk D., Mamcarz A., Furgala-Selezniow G., Glinska-Lewczuk K. (2013): Possibility of artical reproduction of sichel *Pelecus cultratus* (L.) under controlled conditions, *Wulfenia Journal*, 20:82-89 p.
- Kujawa R., Lach M., Pol P., Ptaszkowski M., Macarz A., Nowosad J., Furgala-Selezniow G., Kucharczyk D. (2016): Influence of water salinity on the survival of embryos and growth of the sichel larvae *Pelecus cultratus* (L.) under controlled conditions, *Aquaculture Research*, 48: 1302-1314 p.
- Kumar A., Misra P., Dube A. (2013): Amplified fragment length polymorphism: an adept technique for genome mapping, genetic differentiation, and intraspecific variation in protozoan parasites, *Parasitology Research*, 112: 457-466 p.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms, *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547-1549 p.
- Kumari N., Thakur S., K. (2014): Randomly Amplified Polymorphic DNA – A Brief Review, *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9 (1): 6-13 p.
- Kuznetsov V. A. (2010): Growth, Size-Age Structure of Cathes and Reproduction of the Volga Zander *Sander volgensis* (Percidae) in the upper part of the Volga Stretch of the Kuibyshev Reservoir, *Journal of Ichthyology*, 50:805-810 p.
- Lagouge M., Larsson N.-G. (2013): The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of Internal Medicine*, 273: 529-543 p.
- Landegren U., Nilsson M., Kwok P. (2018): Reading Bits of Genetic Information: Methods for Single-Nucleotide Polymorphism Analysis, *Cold Spring Harbor Laboratory Pre*, 8:769-776 p.
- Lehoczky I., Jeney Zs., Magyary I., Hancz Cs., Kohlmann K. (2005): Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains

kept at the live gene bank at research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary, *Aquaculture*, 247:45-49 p.

- Lenhardt M., Markovic G., Hegedis A., Maletin S., Cirkovic M., Markovic Z. (2011): Non-native and translocated fish species in Serbia and their impact on the native ichthyofauna, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21: 407-421 p.
- Li F-B., Gui J-F. (2008): Clonal diversity and genealogical relationships of gibel carp in four hatcheries, *Animal Genetics*, 39: 28-33 p.
- Liang M., Ya-jie J., De-Xing Z. (2015): Statistical measures of genetic differentiation of populations: Rationales, history and current states, *Current Zoology*, 61:886-897 p.
- Ligny W. de (1969): Serological and biochemical studies in fish populations, *Oceanography and Marine Biology, An Annual Review*, 7, 411-513 p.
- Litt M., 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 p.
- Liu Z. J., Cordes J. F. (2004): DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics, *Aquaculture*, 283: 1-37 p.
- Lovejoy T. E. (1980): Tomorrow's ark: by invitation only. In: International Zoo Yearbook, Volume 20. 1-494 p.
- Ludanny R. I., Chisankova G. G., Prizenko V. K., Bogeruk A. K., Semyenov S. K. (2010): Polymorphism of microsatellite markers in Russian common carp (*Cyprinus carpio* L.) breeds. *Russian Journal of Genetics*, 46: 572-577 p.
- Lynch M., Milligan B. G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers, *Molecular Ecology*, 3: 91-99 p.
- Madeira J. M., Gomez-Moliner B., Barbé A. M. (2005): Genetic introgression on freshwater fish populations caused by restocking programmes, *Biological Invasions*, 7: 117-125 p.
- Martinez J. L., Moran P., Garcia-Vazquez E. (2001): Microsatellite From Atlantic salmon (*Salmo salar*): Characterization and Chromosomal Location, *Journal of Heredity*, 92: 287-290 p.
- Matthes M. C., Daly A., Edwards K. J. (1998): Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). In: Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S. (eds) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0019-6\\_36](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0019-6_36)
- May B., Stoneking M., Wright J. E. (1980): Joint Segregation of Biochemical Loci in Salmonidae. 11. Linkage Associations From a Hybridized *Salvelinus* Genome (*S. namaycush* X *S. fontinalis*), *Genetics*, 95:707-726 p.
- Mayo O. (2008): A Century of Hardy-Weinberg Equilibrium, *Twin Research and Human Genetics*, 3:321-333 p.

- Mccusker M., Bentzen P. (2010): Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes, *Molecular Ecology*, 19: 4852-4862 p.
- Mcdonald D. B., Potts W. K. (1987): DNA Microsatellites as Genetic Markers at Several Scales, *Avian Molecular Evolution and Systematics*, 24-49 p.
- Mesquita N., Carvalho G., Shaw P., Crespo E., Coelho M. M. (2000): River basin-related genetic structuring in an endangered fish species, *Chondrostoma lusitancum*, based on mtDNA sequencing and RFLP analysis, *Heredity*, 86: 253-264 p.
- Mezhzherin S. V., Kokodii S. V., Kulish A. V., Verlatii D. B., Fedorenko L. V. (2012): Hybridization of Crucian Carp *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) in Ukrainian Reservoirs and the Genetic Structure of Hybrids, *Cytology and genetics*, 46(1): 28-35 p.
- Mitton J. B., Grant M. C. (1984): Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 15: 479-499 p.
- Murakami M., Yamashita Y., Fujitani H. (1998). The Complete Sequence of Mitochondrial Genome from a Gynogenetic Triploid "Ginbuna" (*Carassius auratus langsdorfi*), *Zoological science*, 15(3): 335–337 p.
- Murakami M., Matsuba C, Fujitami H. (2001): The maternal origins of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): Phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing, *Genes & Genetic Systems*, 76:25-32 p.
- Müller T., Taller J., Kolics B., Kovács B., Urbányi B., Specziár A. (2010): First record of natural hybridization between pikeperch *Sander lucioperca* and Volga pikeperch *S. volgensis*, *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 481- 484 p.
- Nabholz B., Mauffrey J., Bazin E., Galtier N., Glemin S. (2007): Determination of Mitochondrial Genetic Diversity in Mammals, *Genetics*, 178: 351-361 p.
- Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping, *Science*, 235 (4796): 1616-22 p.
- Nei M. (1972): Genetic distance between populations, *The American Naturalist*, 106: 283-292 p.
- Nei M. (1973): Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321-3323 p.
- Nei M., Li W.-H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(10): 5269-5273 pp.
- Nelson J. S. (1994): Fishes of the world. New York: John Wiley & Sons, Inc. 600 p.

- Nelson J. S., Crossman E. J., Espinosa-Pérez H., Findley L. T., Gilbert C. R., Lea R. N., Williams J. D. (2003): The „Name of Fishes” list, including recommended changes in fish names: Chinook salmon for chinook salmon, and Sander to replace Stizostedion for the sauger and walley, *Fisheries*, 28(7): 38-39 p.
- Nielsen P. E., Egholm M., Berg R. H., Buchardt O. (1991): Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, *Science*, 254 (5037): 1497-1500 p.f
- Nowosad J., Sieszputowska J., Kucharczyka D., Luczynskab J., Sikoraa M., Kujawa R. (2019): Dynamics of mercury content in adult sichel (*Pelecus cultratus* L.) tissues from Baltic Sea before and during spawning, *Marine Environmental Research*, 148:75-80 p.
- O’Connell M., Danzmann R. G., Cornuet J. Wright J. M., Ferguson M. M. (1996): Differentiation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) populations in Lake Ontario and the evaluation of the stepwise mutation and infinite allele mutation models using microsatellite variability, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54: 1391-1399 p.
- O’Connell M., Wright J. M. (1997): Microsatellite DNA in Fishes, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2: 93-112 p.
- Ősz Á., Horváth Á., Hoitsy Gy., Kánainé S. D., Keszte Sz., Sáfrány A. J., Maric S., Palkó Cs., Tóth B., Urbányi B., Kovács B. (2018): The genetic status of the Hungarian brown trout population: exploration of a blind spot on the European map of *Salmo trutta* studies, *PeerJ*, 21:e5152
- Papadopol M. (1982): The study of the biology of reproduction of the german carp, *Carassius auratus gibelio* from the Danube delta, *Buletinul de Cercetari Piscicole*, 1-2: 21-25 p.
- Pauls S. U., Nowak C., Bálint M., Pfenninger M. (2012): The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species, *Molecular Ecology*, 22:925-946 p.
- Peakall R., Smouse P. E. (2012): GenAlex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for Windows and Linux, *Molecular Ecology Resources*, 35:1547-1549 p.
- Pekárik L., Clamporová-Zatovicová Z., Arendt D., Clampor F. (2019): Current stocking program of the sterlet (*Acipenser ruthenus*, L.) can negatively shape its genetic variability in the Middle Danube, *Knowledge and management of aquatic ecosystems*, 420: 1-8 p.
- Pentinsaari M., Salmela H., Mutanen M., Roslin T. (2016): Molecular evolution of a widely-adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life, *Scientific Reports*, 6: 35275
- Perényi M., Biró P. (1991): Yield and recruit estimates of razor fish (*Pelecus cultratus*) in Lake Balaton, *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 24: 2509-2512 p.



- Pickering J., Bamford A., Godbole V., Briggs J., Scozzafava G., Roe P., Wheeler C., Ghouze F., Cuss S. (2002): Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms, *Nucleic Acids Research*, 30(12) e60, 1-7 p.
- Platnick N. I. (1977): Cladograms, Phylogenetic Trees, and Hypothesis Testing, *Systematic Zoology*, 26:438-442 p.
- Podder M., Ruan J., Tripp B. W., Chu Z. E., Tebbutt S. J. (2008): Robust SNP genotyping by multiplex PCR and arrayed primer extension, *BMC Medical Genomics*, 1: 5
- Prince J. A., Feuk L., Howell W. M., Jobs M., Emahazion T., Blennow K., Brookes A. J. (2015): Robust and Accurate Single Nucleotide Polymorphism Genotyping by Dynamic Allele-Specific Hybridization (DASH): Design Criteria and Assay Validation, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Genome Research*, 11:152-162 p.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000): Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data, *Genetics*, 155:945-959 p.
- Rabb G. B. (1994): The Changing Role of Zoological Parks in Conserving Biological Diversity, *American Zoologist*, 34:159-164 p.
- Raffard A., Santoul F., Cucherousset J., Blanchet S. (2019): The community and ecosystem consequences of intraspecific diversity: a meta-analysis, *Biological reviews*, 94:648-661 p.
- Rassmann K., Schlotterer C., Tautz D. (1991): Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting, *Electrophoresis*, 12:113-118 p.
- Ratnashingham S., Hebert P. D. N. (2007): BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)), *Molecular Ecology Notes*, 7:355-364 p.
- Richardson D. M., Pysek P., Rejmanek M., Barbour M. G., Panetta F. D., West C. J. (2000): Naturalization and Invasion of Alien Plants: Concepts and Definitions, *Diversity and Distribution*, 6(2):93-107 p.
- Rohrer G. A., Leeson J. A., Keele J. W., Smith T. P., Beattie C. W. (1994): A Microsatellite Linkage Map of the Porcine Genome, *Genetic Society of America*, 136:231-245 p.
- Ronaghi M., Uhlén M., Nyren P. (1998): A sequencing method based on real-time pyrophosphate, *Science*, 281 (5375): 363-365 p.
- Rousset F. (2008): Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux, *Molecular Ecology Resources*, 8:103-106 p.
- Rozas J., Rozas R. (1995): DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data, *Bioinformatics*, 11(6): 621-625 p.

- Rylková K., Kalous L., Bohlen J., Lamatsch D. K., Petrtyl M. (2013): Phylogeny and biogeographic history of the cyprinid fish genus *Carassius* (Teleostei: Cyprinidae) with focus on natural and anthropogenic arrivals in Europe, *Aquaculture*, 380-383:13-20 p.
- Saiki R. K., Walsh P. S., Levenson C. H., Erlich H. A. (1989): Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86:6230-6234 p.
- Saitho K., Sado T., Mayden R. L., Hanzawa N., Nakamura K., Nishida M., Miya M. (2006): Mitogenomic Evolution and Interrelationships of the Cypriniformes (Actinopterygii: Ostariophysi): The First Evidence Toward Resolution of Higher-Level Relationships of the World's Largest Freshwater Fish Clade Based on 59 Whole Mitogenome Sequences, *Journal of molecular evolution*, 63: 826-841 p.
- Saitou N., Nei M. (1987): The Neighbour-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425 p.
- Sakai H., Iguchi K., Yamazaki Y., Sideleva V. G., Goto A. (2009): Morphological and mtDNA sequence studies on three crucian carps (*Carassius*: Cyprinidae) including a new stock from the Ob River system, Kazakhstan, *Journal of fish biology*, 74(8): 1756–1773 p.
- Sallai Z. (1997): Adatok a körösvidék halfaunájához (Szarvas környékének halai), *A puszta*, 1/4:156-191 p.
- Schlötterer C. (2000): Evolutionary dynamics of microsatellite DNA, *Chromosoma*, 109:365-371 p.
- Schuelke M. (2000): An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments, *Nat Biotechnol* 18: 233–234 p.
- Sriphairoj K., Na-Nakorn U., Klinbunga S. (2018): Species identification of non-hybrid and hybrid *Pangasius* catfish using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, *Agriculture and Natural Resources*, 52(1):99-105 p.
- Sick K. (1961): Haemoglobin polymorphism in fishes, *Nature London*, 192: 894-896 p.
- Slatkin M. (1995): A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies, *Genetics*, 139:457-462 p.
- Specziár A., Bíró P. (2003): Population structure and feeding characteristics of Volga pikeperch, *Sander volgensis* (Pisces, Percidae), in Lake Balaton, *Hydrobiologia*, 506: 505-510 p.
- Specziár A., Bercsényi M., Müller T. (2009): Morphological characteristics of Volga pikeperch (*Sander lucioperca* ♀ X *Sander volgensis* ♂) (Osteichthyes, Percidae), *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 55:39-54 p.

- Step C. A., Kocher T. D. (1997): Molecules and Morphology in Studies of Fish evolution. In: Molecular Systematic of Fishes. *Academic press*. 1-11 p.
- Stockwell C. A., Mulvey M., Vinyardi G. L. (1996): Translocations and the Preservation of Allelic Diversity, *Conservation Biology*, 10:1133-1145 p.
- Sundseth K. (2008): Natura 2000: Protecting Europe's biodiversity, *The European Commission*, 292 p.
- Swingland I. R. (2000): Biodiversity, Definition of. In: Encyclopedia of Biodiversity. Academic Press, 377-391 p.
- Szalay M. (1954): Új halfaj Magyarországon-ezüstkárász, *Halászat*, 1/3:4 p.
- Tabata R., Kakioka R., Tominaga K., Komiya T. Watanabe K. (2016): Phylogeny and historical demography of endemic fishes in Lake Biwa: the ancient lake as a promoter of evolution and diversification of freshwater fishes in western Japan, *Ecology and Evolution*, 6: 2601-2623 p.
- Taggart J., Ferguson A., Mason F. M. (1980): Genetic Variation in Irish Population of Brown trout (*Salmo trutta* L.): Electrophoretic Analysis of Allozymes, *Comparative Biochemistry & Physiology*, 69:393-412 p.
- Tajima F. (1989): Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595 p.
- Takada M., Tachihara K., Kon T., Yamamoto G., Iguchi K, Miya M., Nishida M. (2010): Biogeography and evolution of the *Carassius auratus-complex* in east Asia, *BMC Evolutionary Biology*, 10:07
- Taub F. E., DeLeo J. M., Thompson E. B. (2009): Sequential Comparative Hybridizations Analyzed by Computerized Image Processing Can Identify and Quantitate Regulated RNAs, *DNA*, 2(4): 309-327 p.
- Tautz D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers, *Nucleic Acid Research*, 17:6462-6471 p.
- Taylor E. B., Harvey S., Pollard S., Vaple J. (1997): Postglacial genetic diggerentiation of reproductive ecotypes of kokanee *Onchorcynchus nerka* in Okanagan Lake, British Columbia, *Molecular Ecology*, 6:503-517 p.
- Tebbutt S. J., He J.-Q., Burkett K. M., Ruan J., Opushnyev I. V., Tripp B. W., Zeznik J. A., Abara C. O., Nelson C. C., Walley K. R. (2004): Microarray genotyping resource to determine population stratification in genetic association studies of complex disease, *BioTechniques*, 37:977-985 p.
- Teletchea F. (2009): Molecular idnetification methodes of fish species: reassessment and possible application, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19:265-293 p.
- Terborgh J. (1974): Preservation of Natural Diversity: The Problem of Extinction Prone Species, *BioScience*, 24(12): 715–722 p.
- Tessier N., Bernatchez L., Presa P., Angers B. (1995): Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon, *Journal of Fish Biology*, 10:1133-1145 p.

- Thompson W. E., Ramalho-Santos J., Sutovsky P. (2003): Ubiquitination of Prohibitin in Mammalian Sperm Mitochondria: Possible Roles in the Regulation of Mitochondrial Inheritance and Sperm Quality Control, *Biology of Reproduction*, 69:254-260 p.
- Tobe S. S., Kitchenre A., Linacre A. (2009): Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification-An answer tot he debate, *Forensic Science International: Genetic Supplement*, 2: 306-307 p.
- Toline C. A., Baker A. J. (1995): Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the northern redbelly dace (Phoxinusem), *Molecular Ecology*, 4:745-753 p.
- Triantafyllidis A., Abatzopoulos T. J., Economidis P. S. (1999): Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) populations, assessed by PCR+RFLP analysis of mitochondrial DNA segments, *Heredity*, 82:503-509 p.
- Uchii K., Doi H., Minamoto T. (2016): A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes, *Molecular Ecology Resources*, 16(2):415-422 p.
- United Nations (2015): Transforming our world: The 2030 agenda for sustainable development.  
<https://sustainabledevelopment.un.org/content/documents/21252030%20Agenda%20for%20Sustainable%20Development%20web.pdf>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Un, agenda, 2030, document, pdf
- Urbánková S., Mendel J., Vyskocilová M. (2013): Microsatellite loci for population studies of the genus *Alburnoides* and four other critically endangered and vulnerable cyprinids in the Czech Republic, *Molecular Ecology Resources*, 1:12p.
- Urquhart A., Kimpton C. R., Downes T. J., Gill R. (1994): Variation in Short Tandem Repeat sequencesa survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers, *International Journal of Legal Medicine*, 107:13-20 p.
- Vahrenholz C., Riemen G., Pratje E., Dujon B., Michaelis G. (1993): Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication, *Current Genetics*, 24:241-247 p.
- Vieira M. L. C., Santini L., Diniz A. L., Munhoz C. (2016): Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful, *Genetics and Molecular Biology*, 39(3): 312-328 p.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Homes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, 23:4407-4414 p.
- Wang S., Hard J. J., Utter F. (2001): Genetic variation and fitness in salmonids, *Conservation Genetics*, 3:321-333 p.

- Wang Z., Mao J., Zhou L., Gui J. (2016): Complete mitochondrial genome of wild gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) in the Upper Reaches of the Yangtze River, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU668576.1>
- Ward R. D., Grewe P. M. (1994): Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4:300-325 p.
- Weinberg W. (1908). Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. Jahreshefte des Vereins für vaterländische, *Naturkunde in Württemberg*, 64:369-382 p.
- Weller P., Jeffreys A., J., Wilson V., Blanchetot A. (1984): Organization of the human myoglobin gene, *The EMBO Journal*, 3(2):439-446 p.
- Welsh J., McClelland M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Research*, 18:7213-7218 p.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535 p.
- Wilson E. O. (1988): Biodiversity. Washington, DC: The National Academies Press, 538 p.
- Winfield I. J., Nelson, J. S. (1991): Cyprinid Fishes, Systematics and biogeography: an overview, *Springer science*, 660 p.
- Wolff J. N., Gemmel N. J. (2013): Mitochondria, maternal inheritance and asymmetric fitness: Why males die younger, *Bioessays*, 35:93-99 p.
- Wouters J., Janson S., Luskova V., Olsen K. H. (2012): Molecular identification of hybrids of the invasive gibel carp *Carassius auratus gibelio* and crucian carp *Carassius carassius* in Swedish waters, *Journal of Fish Biology*, 80:2595-2604 p.
- Wright S. (1922): Coefficients of inbreeding and relationship, *The American Naturalist*, 56:330-338 p.
- Yadav P., Kumar A., Hussain S. A., Gupta S. K. (2020) : Evaluation of the effect of longitudinal connectivity in population genetic structure of endangered golden mahseer, *Tor putitora* (Cyprinidae), in Himalayan rivers: Implications for its conservation, *PlosOne*, 15(6): e0234377.
- Yang B., Chen X., Yang J. (2011): Non-native carp of the genus *Cyprinus* in Lake Xingyun, China, as revealed by morphology and mitochondrial DNA analysis, *Biological Invasion*, 13(1):105-114 p.
- Yang Z., Rannala B. (2012): Molecular phylogenetics: principles and practice, *Nature Reviews Genetics*, 13:303-314 p.
- Yue G.-H., Kovács B., Orbán L. (2010): A New Problem with Cross-Species Amplification of Microsatellites: Generation of Non-Homologous Products, *Zoological Research*, 31(2): 131-140 p.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. (2002): Microsatellite isolation: A review Strategies for microsatellite isolation: a review, *Molecular Ecology*, 11:1-16 p.

- Zarei M., Asadi A., Zarei S. M. (2011): Levels of some heavy metal concentration in fishes tissue of southern Caspian Sea, *International Journal of the Physical Sciences*, 6(26):6220-6225 p.
- Zhou L., Wang Y., Gui J. F. (2000): Analysis of genetic heterogeneity among five gynogenetic clones of silver crucian carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch, based on detection of RAPD molecular markers, *Cytogenetics and Cell Genetic*, 88:133-139 p.
- Zhou L, Wang Y., Gui J. F. (2017): Natural artificiation polyploids in aquaculture, *Aquaculture and Fisheries*, 2:103-11 p.

Melléklet 2. A kőszülő vizsgálatához tesztelt mikroszatellit markerek jellemzése

		Azonosító	Primerek	Ismétlődés	Allél szám	Allél méret
Kárané et al. 2019	MS 424	KX375380	F:AGCTAATTTGAGGATGTTATCATG	(GT)16	10	152-181
			R:GTGTAGTAGTGAGGTGCGTGTA			
	MS 423	KX375379	F:GAGATCCATCGGACTAAAGGT	(AC)20	5	144-163
			R:GAGTAGGGCAGTTGCTTCAA			
	MS 701	KX375386	F:CAGAATCACGCAAGCACTC	(AC)25	7	253-287
			R:AGTTGTGCGATGGACTAATGT			
	MS 704	KX375388	F:TGTTCTGGTTTATCTGTTTTGAA	(GT)22	5	236-246
			R:TCTTCGCTGCTTATAGTCTGC			
	MS 404	KX375372	F:CATTGATGCTGTAGCAAGTT	(TG)23	5	330-359
			R:CTCAGTAATCTCCAGGGAGC			
	MS 395	KX375370	F:GTCTCAGGTCGTTGGCATAG	(AC)25	7	217-253
			R:CATGGGATTACAACCTGCTG			
MS 420	KX375377	F:GCTGTTTCACAGGTCCTCACT	(AC)13	5	124-144	
		R:TCCCAGTCGCTGCTTGAT				
MS 417	KX375376	F:CACGCACCTTGTCTCTCTGT	(CA)20	7	260-281	
		R:GACAACAGCCACATCAACG				
MS 192	KX375359	F:ATGTTGAGAGTCAGGCGTGA	(TG)19	17	190-229	
		R:CACGAGGTTATTTATGATAGACATTA				
MS 384	KX375367	F:CAGACAATTCAGTTCGTAGA	(AC)19	5	257-278	
		R:AACATCATCATCGTGGTTGTT				
MS 373	KX375366	F:ATACTTGGATATGCGCTTATTG	(AC)16	9	169-200	
		R:TGCGATTCTCACATGCTG				
MS 703	KX375387	F:GGTCAAGTAAAGAGGTCAACATT	(TG)16	4	128-141	
		AAGCAACAGCAGAGGATGAG				
Kohlmann & Kersten 2008	MSL-1	EF694018	F:TGTTTGTGTCAGCGTCAAGAGG	(CA)39	6	150-170
			R:TTCCGCTCCAACATATCACA			

Melléklet 3. A kőszüllő (*Sander volgensis*) populációk mikroszatellit vizsgálatára során detektált allél méretek

	MS 701		MS 704		MS 404		MSL-1		MS 395	
Balatoni ks 1	298	298	280	280	408	408	245	245	251	251
Balatoni ks 2	304	304	280	280	410	410	245	245	249	255
Balatoni ks 3	298	298	280	280	368	368	245	245	245	255
Balatoni ks 4	298	298	274	280	368	418	245	245	255	269
Balatoni ks 5	298	298	282	282	398	410	235	239	251	251
Balatoni ks 6	298	298	282	282	398	418	239	245	255	269
Balatoni ks 7	298	298	270	270	368	368	243	243	245	255
Balatoni ks 8	298	304	282	282	410	410	243	243	249	249
Balatoni ks 9	298	298	274	282	368	418	241	241	255	269
Balatoni ks 10	298	298	282	282	414	414	243	243	255	269
Balatoni ks 11	304	304	270	282	368	410	243	243	245	267
Balatoni ks 12	308	308	282	282	410	414	239	239	251	251
Balatoni ks 13	298	298	282	282	414	414	243	243	249	249
Balatoni ks 14	298	298	282	282	368	418	243	243	249	249
Balatoni ks 15	298	298	270	282	368	410	243	243	249	255
Balatoni ks 16	298	298	282	282	414	418	237	245	241	249
Balatoni ks 17	298	292	282	282	410	410	239	243	251	245
Balatoni ks 18	304	304	282	282	410	418	239	243	251	269
Balatoni ks 19	298	298	270	282	412	418	239	243	245	245
Balatoni ks 20	298	298	270	270	410	410	239	239	245	251
Balatoni ks 21	308	312	274	282	368	410	243	243	254	267
Balatoni ks 22	298	292	270	282	368	418	243	243	249	249
Balatoni ks 23	298	298	270	282	412	418	239	243	251	251
Balatoni ks 24	298	304	270	270	368	398	239	245	251	251
Balatoni ks 25	298	304	282	282	368	398	243	243	255	255
Balatoni ks 26	298	304	282	282	410	410	237	243	249	255
Balatoni ks 27	298	298	270	282	368	368	243	243	245	249
Balatoni ks 28	298	298	282	282	398	412	239	245	249	251
Balatoni ks 29	298	292	282	282	368	410	243	243	249	249
Balatoni ks 30	298	298	270	282	368	410	239	245	249	245
Balatoni ks 31	298	298	282	270	368	410	239	245	245	245
Balatoni ks 32	298	304	282	282	410	410	243	243	245	251
Balatoni ks 33	298	298	282	282	368	418	239	245	251	251
Balatoni ks 34	298	304	270	282	368	418	245	245	249	249
Balatoni ks 35	298	304	282	282	368	412	243	243	245	245
Balatoni ks 36	298	298	270	282	410	410	245	245	251	271
Balatoni ks 37	304	304	270	282	368	368	237	237	251	251
Balatoni ks 38	298	304	282	282	368	368	235	235	249	249
Balatoni ks 39	298	298	270	282	368	368	231	231	245	255
Balatoni ks 40	304	304	282	282	368	368	231	231	245	251
Balatoni ks 41	298	304	282	282	368	410	237	237	249	255
Balatoni ks 42	298	298	282	282	408	420	231	231	245	251
Balatoni ks 43	304	304	282	282	368	410	237	237	241	245
Balatoni ks 44	298	298	282	290	368	368	237	237	249	249
Balatoni ks 45	298	298	282	290	410	410	237	237	249	249



Balatoni ks 46	286	298	270	282	368	368	0	0	251	251
Balatoni ks 47	304	304	282	282	368	368	241	241	251	251
Balatoni ks 48	298	298	270	282	368	368	231	235	245	245
Balatoni ks 49	298	308	282	282	368	368	239	239	251	269
Balatoni ks 50	298	298	282	286	368	368	231	239	245	245
Balatoni ks 51	304	304	282	282	368	368	239	239	241	251
Balatoni ks 52	298	304	282	290	368	368	231	235	251	251
Balatoni ks 53	298	298	282	282	408	408	239	239	245	251
Balatoni ks 54	298	298	278	278	412	412	239	239	251	251
Balatoni ks 55	298	298	278	286	410	416	233	239	255	255
Balatoni ks 56	298	286	280	280	368	368	237	241	245	245
Balatoni ks 57	298	286	280	280	416	416	239	239	269	269
Balatoni ks 58	304	304	266	280	368	368	235	235	249	249
Balatoni ks 59	298	304	278	278	368	410	235	235	251	251
Balatoni ks 60	298	304	282	282	368	368	237	237	249	251
Balatoni ks 61	298	298	280	266	368	398	239	239	249	259
Balatoni ks 62	298	308	276	276	368	420	237	237	251	251
Balatoni ks 63	304	304	280	268	368	368	239	239	259	259
Balatoni ks 64	298	298	280	266	408	408	239	239	251	259
Balatoni ks 65	304	298	282	266	368	368	233	241	249	249
Balatoni ks 66	298	298	280	280	420	420	235	235	251	251
Balatoni ks 67	304	298	270	278	408	420	233	239	251	251
Balatoni ks 68	298	298	282	266	408	420	231	239	251	269
Balatoni ks 69	304	298	276	266	410	410	239	239	251	259
Balatoni ks 70	298	298	280	280	368	408	239	239	249	249
Balatoni ks 71	304	304	282	272	368	408	239	239	251	251
Balatoni ks 72	298	298	268	280	408	408	235	241	249	249
Tisza_Holtkoros 1	302	302	282	282	410	410	235	235	241	245
Tisza_Holtkoros 2	298	304	282	282	408	408	235	235	241	263
Tisza_Holtkoros 3	298	302	282	286	408	408	231	243	241	245
Tisza_Holtkoros 4	302	302	282	282	408	408	235	235	245	251
Tisza_Holtkoros 5	298	302	282	282	408	408	235	235	241	245
Tisza_Holtkoros 6	298	302	278	282	408	408	235	235	241	251
Tisza_Holtkoros 7	302	308	282	282	408	408	235	235	249	251
Tisza_Holtkoros 8	298	298	282	282	410	410	237	237	245	251
Tisza_Holtkoros 9	298	298	286	286	408	408	237	237	249	251
Tisza_Holtkoros 10	298	304	282	282	408	408	237	237	251	251
Tisza_Holtkoros 11	302	302	282	282	408	408	231	231	251	245
Tisza_Holtkoros 12	298	304	282	282	408	408	0	0	241	251
Dunai ks 1	304	304	280	280	408	398	239	239	251	251
Dunai ks 2	312	312	280	282	408	398	231	239	251	251
Dunai ks 3	304	304	280	280	408	398	239	239	251	245
Dunai ks 4	298	308	278	278	408	398	239	239	251	251
Dunai ks 5	304	304	282	282	408	398	0	0	245	251
Dunai ks 6	308	308	270	280	408	398	231	231	245	251
Dunai ks 7	308	308	280	280	408	398	231	231	245	251
Dunai ks 8	302	302	280	280	408	398	237	241	251	251
Dunai ks 9	312	312	280	280	0	0	231	237	251	251
Dunai ks 10	304	304	270	280	408	398	239	231	241	249
Dunai ks 11	312	312	282	282	408	398	239	239	245	254

Dunai ks 12	308	308	280	282	408	398	239	239	249	249
Dunai ks 13	308	308	280	282	408	408	239	239	251	251
Dunai ks 14	304	304	278	282	408	408	239	239	251	251
Dunai ks 15	304	304	280	282	408	408	239	239	249	249
Dunai ks 16	298	308	280	282	408	408	239	239	0	0
Dunai ks 17	304	304	282	282	408	398	239	239	251	251
Dunai ks 18	308	308	270	282	408	408	239	239	251	251
Dunai ks 19	308	308	282	282	408	398	231	239	251	251
Dunai ks 20	302	302	270	270	408	398	231	239	251	245
Dunai ks 21	304	304	280	282	408	398	239	239	251	245
Dunai ks 22	298	308	282	282	408	398	231	239	249	249
Dunai ks 23	308	312	282	282	408	398	237	237	249	249
Dunai ks 24	304	304	272	280	408	398	231	237	245	251
Dunai ks 25	308	308	282	282	408	398	231	231	251	251
Dunai ks 26	302	302	280	282	408	408	239	239	249	249
Dunai ks 27	298	308	270	280	406	406	231	239	251	245
Dunai ks 28	308	308	280	282	408	398	231	231	0	0
Dunai ks 29	298	308	0	0	408	398	0	0	251	251
Dunai ks 30	308	308	280	282	408	398	241	231	0	0
Dunai ks 31	308	308	270	280	408	398	231	239	251	251
Dunai ks 32	298	298	272	280	408	398	239	239	251	245
Dunai ks 33	308	308	272	280	408	398	239	239	251	251
Dunai ks 34	304	304	270	282	408	398	239	239	251	251

Melléklet 4. Kősüllő mikroszatellit vizsgálatok során detektált allél-frekvenciák markerenként az egyes populációkban (Balaton, Duna, Tisza-Holt-Körös) ,ahol az első oszlopok a marker elnevezése (MS 701, MS 704, MS 404, MS1-1, MS 395), alattuk az allél méretek és a további oszlopokban a 3 populációnkénti frekvenciájuk.

<b>MS 701</b>	<b>Balaton</b>	<b>Tisza_Holt-Körös</b>	<b>Duna</b>
286	2,08	-	-
292	2,08	-	-
298	65,97	41,67	10,29
302	-	41,67	8,82
304	25,69	12,50	29,41
308	3,47	4,17	41,18
312	0,69	-	10,29

<b>MS 704</b>	<b>Balaton</b>	<b>Tisza_Holt-körös</b>	<b>Duna</b>
266	4,17	-	-
268	1,39	-	-
270	14,58	-	12,12
272	0,69	-	4,55
274	2,08	-	-
276	2,08	-	-
278	4,17	4,17	4,55
280	13,89	-	39,39
282	53,47	83,33	39,39
286	1,39	12,50	-
290	2,08	-	-

<b>MS 404</b>	<b>Balaton</b>	<b>Tisza_Holt- körös</b>	<b>Duna</b>
368	43,06	-	-
398	4,17	-	39,39
406	-	-	3,03
408	9,03	83,33	57,58
410	21,53	16,67	-
412	4,17	-	-
414	4,17	-	-
416	2,08	-	-
418	7,64	-	-
420	4,17	-	-

<b>MSL-1</b>	<b>Balaton</b>	<b>Tisza_Holt- körös</b>	<b>Duna</b>
231	7,04	13,64	28,13
233	2,11	-	-
235	8,45	54,55	-
237	11,97	27,27	7,81
239	28,87	-	60,94
241	4,93	-	3,13
243	23,24	4,55	-
245	13,38	-	-

<b>MS 395</b>	<b>Balaton</b>	<b>Tisza_Holt- körös</b>	<b>Duna</b>
241	2,08	25,00	1,61
245	17,36	25,00	16,13
249	25,00	8,33	17,74
251	32,64	37,50	62,90
254	0,69	-	1,61
255	10,42	-	-
259	3,47	-	-
263	-	4,17	-
267	1,39	-	-
269	6,25	-	-
271	0,69	-	-

Melléklet 5. Kősüllő mikroszatellit vizsgálatok során detektált privát allélok helye, az őket hordozó egyedek és az allél méretekkel

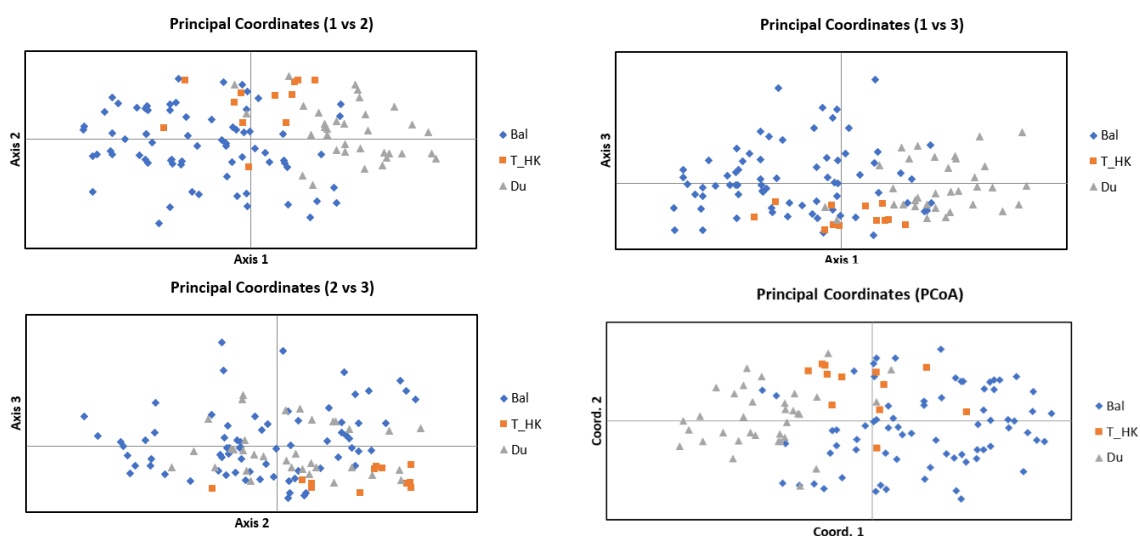
Minta	MS 701		MS 704		MS 404		MSL-1		MS 395		A privát allélt hordozó lókuszlókuszok
Bal 1	298	298	280	280	408	408	245	245	251	251	MSL-1
Bal 2	304	304	280	280	410	410	245	245	249	255	MSL-1, MS 395
Bal 3	298	298	280	280	368	368	245	245	245	255	MS 404, MSL-1, MS 395
Bal 4	298	298	274	280	368	418	245	245	255	269	MS 704, MS 404, MSL-1, MS 395
Bal 6	298	298	282	282	398	418	239	245	255	269	MS 404, MSL-1, MS 395
Bal 7	298	298	270	270	368	368	243	243	245	255	MS 404, MS 395
Bal 9	298	298	274	282	368	418	241	241	255	269	MS 704, MS 404, MS 395
Bal 10	298	298	282	282	414	414	243	243	255	269	MS 404, MS 395
Bal 11	304	304	270	282	368	410	243	243	245	267	MS 404, MS 395
Bal 12	308	308	282	282	410	414	239	239	251	251	MS 404
Bal 13	298	298	282	282	414	414	243	243	249	249	MS 404
Bal 14	298	298	282	282	368	418	243	243	249	249	MS 404
Bal 15	298	298	270	282	368	410	243	243	249	255	MS 404, MS 395
Bal 16	298	298	282	282	414	418	237	245	241	249	MS 404, MSL-1
Bal 17	298	292	282	282	410	410	239	243	251	245	MS 701
Bal 18	304	304	282	282	410	418	239	243	251	269	MS 404, MS 395
Bal 19	298	298	270	282	412	418	239	243	245	245	MS 404
Bal 21	308	312	274	282	368	410	243	243	254	267	MS 704, MS 404, MS 395
Bal 22	298	292	270	282	368	418	243	243	249	249	MS 701, MS 404
Bal 23	298	298	270	282	412	418	239	243	251	251	MS 404
Bal 24	298	304	270	270	368	398	239	245	251	251	MS 404, MSL-1
Bal 25	298	304	282	282	368	398	243	243	255	255	MS 404, MS 395
Bal 26	298	304	282	282	410	410	237	243	249	255	MS 395
Bal 27	298	298	270	282	368	368	243	243	245	249	MS 404
Bal 28	298	298	282	282	398	412	239	245	249	251	MS 404, MSL-1
Bal 29	298	292	282	282	368	410	243	243	249	249	MS 701, MS 404
Bal 30	298	298	270	282	368	410	239	245	249	245	MS 404, MSL-1
Bal 31	298	298	282	270	368	410	239	245	245	245	MS 404, MSL-1
Bal 33	298	298	282	282	368	418	239	245	251	251	MS 404, MSL-1
Bal 34	298	304	270	282	368	418	245	245	249	249	MS 404, MSL-1
Bal 35	298	304	282	282	368	412	243	243	245	245	MS 404
Bal 36	298	298	270	282	410	410	245	245	251	271	MSL-1, MS 395
Bal 37	304	304	270	282	368	368	237	237	251	251	MS 404
Bal 38	298	304	282	282	368	368	235	235	249	249	MS 404
Bal 39	298	298	270	282	368	368	231	231	245	255	MS 404, MS 395
Bal 40	304	304	282	282	368	368	231	231	245	251	MS 404
Bal 41	298	304	282	282	368	410	237	237	249	255	MS 404, MS 395
Bal 42	298	298	282	282	408	420	231	231	245	251	MS 404
Bal 43	304	304	282	282	368	410	237	237	241	245	MS 404
Bal 44	298	298	282	290	368	368	237	237	249	249	MS 704, MS 404
Bal 45	298	298	282	290	410	410	237	237	249	249	MS 704
Bal 46	286	298	270	282	368	368	-1	-1	251	251	MS 701, MS 404

Bal 47	304	304	282	282	368	368	241	241	251	251	MS 404
Bal 48	298	298	270	282	368	368	231	235	245	245	MS 404
Bal 49	298	308	282	282	368	368	239	239	251	269	MS 404, MS 395
Bal 50	298	298	282	286	368	368	231	239	245	245	MS 404
Bal 51	304	304	282	282	368	368	239	239	241	251	MS 404
Bal 52	298	304	282	290	368	368	231	235	251	251	MS 704, MS 404
Bal 54	298	298	278	278	412	412	239	239	251	251	MS 404
Bal 55	298	298	278	286	410	416	233	239	255	255	MS 404, MSL-1, MS 395
Bal 56	298	286	280	280	368	368	237	241	245	245	MS 701, MS 404
Bal 57	298	286	280	280	416	416	239	239	269	269	MS 701, MS 404, MS 395
Bal 58	304	304	266	280	368	368	235	235	249	249	MS 704, MS 404
Bal 59	298	304	278	278	368	410	235	235	251	251	MS 404
Bal 60	298	304	282	282	368	368	237	237	249	251	MS 404
Bal 61	298	298	280	266	368	398	239	239	249	259	MS 704, MS 404, MS 395
Bal 62	298	308	276	276	368	420	237	237	251	251	MS 704, MS 404
Bal 63	304	304	280	268	368	368	239	239	259	259	MS 704, MS 404, MS 395
Bal 64	298	298	280	266	408	408	239	239	251	259	MS 704, MS 395
Bal 65	304	298	282	266	368	368	233	241	249	249	MS 704, MS 404, MSL-1
Bal 66	298	298	280	280	420	420	235	235	251	251	MS 404
Bal 67	304	298	270	278	408	420	233	239	251	251	MS 404, MSL-1
Bal 68	298	298	282	266	408	420	231	239	251	269	MS 704, MS 404, MS 395
Bal 69	304	298	276	266	410	410	239	239	251	259	MS 704, MS 395
Bal 70	298	298	280	280	368	408	239	239	249	249	MS 404
Bal 71	304	304	282	272	368	408	239	239	251	251	MS 404
Bal 72	298	298	268	280	408	408	235	241	249	249	MS 704
T_HK 2	298	304	282	282	408	408	235	235	241	263	MS 395
Du 27	298	308	270	280	406	406	231	239	251	245	MS 404

Melléklet 6. A kősüllő mikroszatellit markerek Hardy-Weinberg egyensúlyi vizsgálat során az egyes populációkon markereként mért szignifikancia szintek ,ahol Bal:Balaton, T\_HK: Tisza\_Holt-Körös, Du: Duna, DF:szabadságfok, Prob:valószínűség, ChiSq:khi-négyzet, Signif: \*/\*\*\*: szignifikáns eltérés, ns: nem szignifikáns eltérés

Pop	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
Bal	MS 701	15	54,657	0,000	***
Bal	MS 704	55	146,922	0,000	***
Bal	MS 404	36	145,378	0,000	***
Bal	MSL-1	28	195,045	0,000	***
Bal	MS 395	45	154,431	0,000	***
T_HK	MS 701	6	6,000	0,423	ns
T_HK	MS 704	3	4,653	0,199	ns
T_HK	MS 404	1	12,000	0,001	***
T_HK	MSL-1	6	23,222	0,001	***
T_HK	MS 395	10	9,704	0,467	ns
Du	MS 701	10	91,765	0,000	***
Du	MS 704	10	20,895	0,022	*
Du	MS 404	3	48,449	0,000	***
Du	MSL-1	6	16,474	0,011	*
Du	MS 395	10	37,676	0,000	***

Melléklet 7. Kősüllő populációk diverzitásának főtenhely koordináta ábrázolásai , ahol az egyedek megoszlásából mért differenciációt a populáció (kék-Balaton, narancs-Tisza\_Holt-Körös, szürke-Duna) páronkénti mátrix egyes tengelyeire (Axis 1, Axis 2, Axis 3), illetve a fő koordinátára (Coord. 1, Coord. 2) levetítve mutatja be.



Melléklet 8. Az ezüstkárász filogenetikai törzsfáihoz beillesztett referencia szekvenciák

Azonosító	Faj	Szerző	Cikk
JN117610.1	<i>Carassius gibelio</i>	Wouters et al. 2012	Molecular identification of hybrids of the invasive gibel carp <i>Carassius auratus gibelio</i> and crucian carp <i>Carassius carassius</i> in Swedish waters
MF036180.1	<i>Carassius gibelio</i>	Agdamar, 2018	High genetic diversity in an invasive freshwaterfish species, <i>Carassius gibelio</i> , suggests establishment success at the frontier between native and invasive ranges
AB377299.1	<i>Carassius gibelio</i>	Komiyama et al. 2009	An evolutionary origin and selection process of goldfish
EF633628.1	<i>Carassius auratus gibelio</i>	Li & Gui, 2008	Clonal diversity and genealogical relationships of gibel carp in four hatcheries
KC243414.1	<i>Carassius gibelio</i>	Japoshvili et al. 2013	Invasive <i>Carassius</i> carp in Georgia: Current state of knowledge and future perspective
AB379957.1	<i>Carassius auratus auratus</i>	Komiyama et al. 2009	An evolutionary origin and selection process of goldfish
Ab377291.1	<i>Carassius auratus buergeri</i>	Komiyama et al. 2009	An evolutionary origin and selection process of goldfish
LC019787.1	<i>Carassius cuvieri</i>	Uchii et al., 2016	A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes
JN117597.1	<i>Carassius Carassius</i>	Wouters et al. 2012	Molecular identification of hybrids of the invasive gibel carp <i>Carassius auratus gibelio</i> and crucian carp <i>Carassius carassius</i> in Swedish waters
JX122531.1	<i>Cyprinus carpio haematopterus</i>	Yang et al. 2011	Non-native carp of the genus <i>Cyprinus</i> in Lake Xingyun, China, as revealed by morphology and mitochondrial DNA analysis
JQ390593.1	<i>Cyprinus carpio</i>	Kohlmann & Kersten, 2013	Deeper insight into the origin and spread of European common carp ( <i>Cyprinus carpio carpio</i> ) based on mitochondrial D-loop sequence polymorphisms
DQ399929.1	<i>Carassius gibelio</i>	Kalous et al. 2007	First European record of <i>carassius langsdorfii</i> from the Elbe basin
DQ399926.1	<i>Carassius gibelio</i>	Kalous et al. 2007	First European record of <i>carassius langsdorfii</i> from the Elbe basin
HM008685.1	<i>Carassius gibelio</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
HM000020.1	<i>Carassius gibelio</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
HM000009.1	<i>Carassius gibelio</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)

Azonosító	Faj	Szerző	Cikk
HM000008.1	<i>Carassius gibelio</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
FJ478019.1	<i>Carassius gibelio</i>	Apalikova et al. 2011	Phylogenetic Relationships of Silver Crucian Carp <i>Carassius auratus gibelio</i> , <i>C. auratus cuvieri</i> , Crucian Carp <i>Carassius carassius</i> , and Common Carp <i>Cyprinus carpio</i> As Inferred from Mitochondrial DNA Variation
HM008684.1	<i>Carassius gibelio</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
FJ822041.1	<i>Carassius gibelio</i>	Apalikova et al. 2011	Phylogenetic Relationships of Silver Crucian Carp <i>Carassius auratus gibelio</i> , <i>C. auratus cuvieri</i> , Crucian Carp <i>Carassius carassius</i> , and Common Carp <i>Cyprinus carpio</i> As Inferred from Mitochondrial DNA Variation
JN402305.1	<i>Carassius gibelio</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
HM008678.1	<i>Carassius gibelio</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
AB368700.1	<i>Carassius auratus</i>	Takada et al. 2010	Biogeography and evolution of the <i>Carassius auratus</i> -complex in East Asia
GU170378.1	<i>Carassius gibelio</i>	Podlesnykh et al. 2009	Phylogenetic relationships among crucian carp ploidy forms <b>(Unpublished)</b>
DQ868925.1	<i>Carassius sp.</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
DQ868924.1	<i>Carassius sp.</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
DQ868926.1	<i>Carassius sp.</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
HM008690.1	<i>Carassius sp.</i>	Kalous et al. 2012	Hidden diversity within the Prussian carp and designation of a neotype for <i>Carassius gibelio</i> (Teleostei: Cyprinidae)
AY347293.1	<i>Cyprinus carpio</i>	Zhou et al. 2003	Phylogenetic study for three subspecies of common carp <i>Cyprinus carpio</i> , based on sequence analysis of cytochrome B control region of mtDNA <b>(Unpublished)</b>



Melléklet 9. Ezüstkárász (*Carassius gibelio*) citokróm *b* (9/a) és citokróm oxidáz I (9/b) haplotípusok és az őket meghatározó polimorf bázisok

```

MATRIX
[           10           20           ]
[           *           *           ]
HapCb_1 TTTTATGTACGGCCACATCAGTAACCC
HapCb_2 ....G.....G.....
HapCb_3 .CCC.CAAGTAAT.GG..TGACG.T..
HapCb_4 C.....T.....T....G...
HapCb_5 .....A.....TT.....TT
HapCb_6 ....G.....GC.....
;
END;

```

9/a, Ezüstkárász citokróm *b* haplotípusok és polimorf bázisaik

```

MATRIX
[           ]
[           ]
HapCol_1 TGA
HapCol_2 .A.
HapCol_3 C..
HapCol_4 .AG
;
END;

```

9/b, Ezüstkárász citokróm oxidáz I. haplotípusok és polimorf bázisaik

Melléklet 10. Garda filogenetikai vizsgálata során használt referencia szekvenciák és eredetük

Azonosító	Faj	Szerző	Cikk
DQ664491.1	<i>Leuciscus leuciscus</i>	Costedoat et al., 2006	Heterogeneous colonization pattern of European Cyprinids, as highlighted by the dace complex (Teleostei: Cyprinidae)
AJ388404.1	<i>Abramis brama</i>	Gilles & Lecointre, 1999	A more accurate phylogeny of european cyprinids based on the mitochondrial control region ( <b>nincs publikálva</b> )
FJ188382.1	<i>Rutilus rutilus</i>	Tumnoi et al. 2008	Csak a szekvencia elérhető
AJ388402.1	<i>Leucaspis delineatus</i>	Gilles & Lecointre, 1999	A more accurate phylogeny of european cyprinids based on the mitochondrial control region ( <b>nincs publikálva</b> )
AJ388401.1	<i>Alburnus alburnus</i>	Gilles & Lecointre, 1999	A more accurate phylogeny of european cyprinids based on the mitochondrial control region ( <b>nincs publikálva</b> )
AJ388410.1	<i>Phoxinus phoxinus</i>	Gilles & Lecointre, 1999	A more accurate phylogeny of european cyprinids based on the mitochondrial control region ( <b>nincs publikálva</b> )
MH797174.1	<i>Rhodeus ocellatus</i>	Cheng et al. 2018	Csak a szekvencia elérhető
LC098114.1	<i>Pseudorasbora parva</i>	Tabata et al. 2016	Phylogeny and historical demography of endemic fishes in Lake Biwa: the ancient lake as a promoter of evolution and diversification of freshwater fishes in western Japan
AJ388393.1	<i>Gobio gobio</i>	Gilles & Lecointre, 1999	A more accurate phylogeny of european cyprinids based on the mitochondrial control region ( <b>nincs publikálva</b> )
KF395261.1	<i>Rhinichthys atratulus</i>	Kraczkowski & Chernoff, 2014	Molecular Phylogenetics of the Eastern and Western Blacknose Dace, <i>Rhinichthys atratulus</i> and <i>R. obtusus</i> (Teleostei: Cyprinidae)
L07753.1	<i>Cyprinella sprioptela</i>	Broughton & Dowling, 1994	Length variation in mitochondrial DNA of the minnow <i>Cyprinella</i>

AJ388411.1	<i>Tinca tinca</i>	Gilles & Lecointre, 1999	A more accurate phylogeny of european cyprinids based on the mitochondrial control region ( <b>nincs publikálva</b> )
MH797241.1	<i>Pseudobrama simoni</i>	Cheng et al. 2018	Csak a szekvencia elérhető
MN958523.1	<i>Megalobrama terminalis</i>	Hu & Shi, 2020	Genetic differentiation between <i>Megalobrama terminalis</i> in the Heilong River and other fish speices in the genus <i>Megalobrama</i>
MN958485.1	<i>Megalobrama amblycephala</i>	Hu & Shi, 2020	Genetic differentiation between <i>Megalobrama terminalis</i> in the Heilong River and other fish speices in the genus <i>Megalobrama</i>
AB274417.1	<i>Carassius carassius</i>	Sakai et al. 2009	Morphological and mtDNA sequence studies on three crucian carps ( <i>Carassius</i> : Cyprinidae) including a new stock from the Ob River system, Kazakhstan
AB008802.1	<i>Carassius auratus</i>	Murakami et al. 1998	The Complete Sequence of Mitochondrial Genome from a Gynogenetic Triploid 'Ginbuna' ( <i>Carassius auratus langsdorfii</i> )
KX576714.1	<i>Cyprinus carpio</i>	Fu & Dong, 2016	Csak a szekvencia elérhető

Melléklet 11. Garda filogenetikai vizsgálata során használt mikroszatellit markerek ismertetői

Faj	Primer	Primer szekvencia	Ismétlődő régió	Génbanki azonosító
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	Albi 22	CAGGAGCCACTGTAGTGC	(AC) <sub>31</sub> (AA) <sub>1</sub>	JX228956
		GGGACTGGTGGATTCATAGAC		
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	Albi 61	AACTCCCTCGCGTGCC	(AC) <sub>30</sub>	JX228957
		ATATTGATCAGCGCTTTGTGCG		
<i>Alburnoides bipunctatus</i>	Albi462A	CTCCATTGTGCCACATACAC	(AC) <sub>23</sub>	KC161205
		CCAGAGATCAGCGCTCAG		
<i>Gobio gobio</i>	Gob28	CGCCACAACAGCTCAGACTC	(GT) <sub>9</sub> (GA) <sub>4</sub> (GT) <sub>3</sub>	DQ207805
		CGGTATGTACAAGCCAGATGAA		
<i>Cyprinus carpio</i>	MFW19	GAATCCTATCATGCAAAC	(CA) <sub>16</sub>	DQ780025
		GCACAAACTCCACATTGTGCC		
<i>Leuciscus leuciscus</i>	CypG24	CTGCCGCATCAGAGATAAACACTT	(CAGA) <sub>19</sub>	AY439142
		TGGCGGTAAGGGTAGACCAC		
<i>Rutilus rutilus</i>	Rru3	GGGGAGTCTGGCTTCAGG	(GT) <sub>7</sub> A(TG) <sub>6</sub>	AB112739
		CGGCACACAGGGAGGTTA		
<i>Telestes souffia</i>	BI1-153	GCACAGCTCTAATCGGTCCT	(AC) <sub>20</sub>	FJ468350
		TATGGTCAAACACGGGTCAA		
<i>Telestes souffia</i>	BI2-114	ATCACTGCCATTTTATTA	(TC) <sub>5</sub> TA(TC) <sub>22</sub>	FJ468352
		CTGCTCCGCTCTGTTCCA		
<i>Cyprinus carpio</i>	MFW1	FGTCCAGACTGTCATCAGGAG	CA	Crooijmans et al. 1997
		GAGGTGTACTGAGTCACGC		
<i>Cyprinus carpio</i>	MFW9	FGATCTGCAAGCATATCTGTGCG	CA	Crooijmans et al. 1998
		ATCTGAACCTGCAGCTCCTC		

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni a rengeteg segítséget és támogatást, amit az elmúlt években munkámhoz és a dolgozat elkészítéséhez kaptam az **Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet munkatársainak**, külön kiemelve:

- **Dr. Kovács Balázs**, témavezetőmet, aki 2014 óta mentorál, először a mesterképzésen, majd a doktori tanulmányaim során. Az elmúlt pár évben mind szakmailag, mind emberileg egy kiváló személyt ismertem meg benne, akihez bármikor bizalommal fordulhattam szakmai tanácsért.
- **Dr. Urbányi Bélának és Dr. Kriszt Baláznak** az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet vezetőinek, akik nélkül szintén nem jöhetett volna létre ez a munka. Köszönöm nekik, hogy már 2015-ben bizalmat szavaztak nekem, így tanszéki demonstrátor lehettem és azóta is töretlenül támogatják szakmai fejlődésemet.
- Szeretnék külön köszönetet mondani **Kánainé Dr. Sipos Dóra Ildikónak**, aki meglátásaival, szakmai segítségével, tanácsaival mindig segített, ha hozzáfordultam. Rengeteget tanultam tőle.
- Köszönet illeti a terepre jutás segítéséért, a mintagyűjtésekért és azok szervezéséért **Dr. Bokor Zoltánt, Dr. Bernáth Gergelyt, Dr. Várkonyi Leventét, Molnár Józsefet és minden velük dolgozó hallgatót, akik az évek során segítették munkámat.**
- Külön szeretném kiemelni és megköszönni a segítséget a Természetesvízi Halökológia Tanszék dolgozóinak, **Dr. Ferincz Árpádnak, Dr. Staszny Ádámnak, Dr. Weiperth Andrásnak, Lente Verának és Hegedűs Annának**, hogy a véghajrában együtt dolgozhattunk és segítettek. Nélkülük ez a dolgozat nem készülhetett volna el.
- Szeretném megköszönni, a mintáim feldolgozásához és a laborozáshoz nyújtott sok segítséget **Balogh Rékának, Tóth-Ihász Katalinnak és a korábbi Regionális Egyetemi Tudásközpont minden dolgozójának.**
- Hálával tartozom **Bíró Adrienn, Mészáros Orsolya, Kovács István György és Somogyi Barnabás** hallgatóimnak munkájukért és szorgalmukért.

Végezetül szavakban nem is tudom kifejezni mennyire hálás vagyok **Családomnak és Páromnak**, akik mindig hittek bennem, végtelen türelemmel voltak felém, bátorítottak, tartották bennem a lelket és végig támogattak, sosem hagyva, hogy feladjam, a legnagyobb akadályok előtt sem.

Munkámat a **GINOP-2.3.2-15-2016-00004**, a **TKP2020-NKA-16**, valamint az **EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008** számú projektek támogatták. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.