



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**HAZAI SEBESPISTRÁNG-ÁLLOMÁNYOK GENETIKAI HÁTTERÉNEK
FELMÉRÉSE ÉS EGY GENETIKAI MARKEREKRE ALAPOZOTT TENYÉSZTÉSI
RENDSZER KIALAKÍTÁSA**

DOI: 10.54598/000760

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Ősz Ágnes

Gödöllő

2021

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élettani és Takarmányozástani Intézet
Takarmánybiztonsági Tanszék

Témavezető: Dr. Horváth Ákos
egyetemi tanár
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

Dr. Kovács Balázs
tudományos főmunkatárs
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Molekuláris Ökológiai Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK	5
2. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	7
2.1. Helyszínek és mintavétel	7
2.2. DNS izolálás	8
2.3. Sebes pisztráng populációk ivararányának vizsgálata.....	8
2.4. Sebes pisztráng populációk vizsgálata mitokondriális és sejtmagi genom szintjén.....	8
2.4.1. PCR-RFLP markerek	9
2.4.2. Mitokondriális genom szekvenálás.....	10
2.4.3. Mikroszatellit markerek	11
2.4.4. Populációgenetikai és a markerek jellemzéséhez használt szoftverek.....	12
2.5. Genetikai markerekre alapozott tenyésztési rendszer kialakítása és F1 generáció létrehozása	13
3. EREDMÉNYEK	15
3.1. Ivar megoszlása a vizsgált sebes pisztráng populációkban	15
3.2. Sebes pisztráng vérvonalak aránya a vizsgált populációkban	15
3.2.1. Mitokondriális DNS varianciája	15
3.2.2. Sejtmagi DNS varianciája.....	19
3.3. A sebes pisztráng állományok populációgenetikai állapota a sejtmagi markerek vizsgálata alapján.....	19
3.3.1. Az állományok populáción belüli genetikai diverzitása	19
3.3.2. A vizsgált populációk közti genetikai diverzitás mértéke	22
3.4. Genetikai markerekre alapozott tenyésztési rendszer kialakítása.....	25
4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	27
4.1. A hazai sebes pisztráng állományok evolúciós vonal szerinti csoportosítása	27
4.2. A hazai sebes pisztráng állományok populációgenetikai állapota.....	29
5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	32
6. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK	33
6.1. Az értekezés témakörében megjelent tudományos publikációk.....	33
6.2. Az értekezés témájában tartott előadások.....	33
6.3. Az értekezés témájában megjelent poszter, absztrakt	34
6.4. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent tudományos publikációk	35
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	37

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A tengeri halászati ágazatban a fogások mértékének csökkenése, ingadozása és a túlhalászás jellemző, így a globálisan növekvő halhús fogyasztás iránti igény kielégítését az akvakultúrás termelés folyamatos növekedése teszi lehetővé, amihez szükségesek a tenyésztés- és tartástechnológiai fejlesztések. A hagyományos tenyésztési módszereken túl egyre jelentősebbek a molekuláris genetikai markerekre alapozott tenyésztési rendszerek, melyek a molekuláris genetikai módszerek fejlődése és a különböző DNS-markerek feltárása révén jöhettek létre.

A lazacfélék a legjobban kutatott édesvízi, tenyésztett halfajok közé tartoznak, ami az egyes fajok gazdasági jelentőségével, és a fajokon belüli nagymértékű populációsintű diverzitásukkal magyarázható. Húsuk ízletességének, szálkamentességének, és a fajok viszonylag jó technológiatűrésének köszönhetően a mesterséges tartás és szaporítás módszerei hamar kialakultak. Napjainkban a világ legjelentősebb intenzív körülmények között termelt halfajai a lazacfélék. A sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) Európa őshonos pisztrángfaja, mely széleskörűen elterjedt, nagy gazdasági jelentőséggel bír, és a világ számos országában telepítették és tenyésztik. A faj a sebes sodrású, oxigénben gazdag, hideg vizek lakója, jelenleg inkább természetvédelmi, és rekreációs jelentősége van, így az eladott mennyiség is főként a patakok telepítésére szolgál. Napjainkban Magyarország nagyjából 1200 kilométernyi, a sebes pisztráng számára megfelelő természetes vízterülettel rendelkezik, azonban alkalmas ívóhelyek hiányában, önfenntartó állományai a hidegebb vizű, tiszta hegyvidéki patakokra korlátozódnak. Hazánkban Lillafüreden nagyobb mennyiségben, és fajtamegőrzési céllal, kisebb mennyiségben Szilvásváradon is tenyésztik az őshonos sebes pisztrángot.

A sebes pisztráng molekuláris vizsgálatai feltárták a faj nagymértékű genetikai diverzitását, és az európai természetes állományainak elemzése során, a földrajzi elszigeteltségből adódó és a helyi viszonyokhoz alkalmazkodó öt, a mitokondriális DNS alapján elkülöníthető evolúciós vonalát azonosították: atlanti, dunai, mediterrán, adriai, és márvány. Az egyes vonalak a különböző hidrogeográfiai területekhez kapcsolódik, melyek az utolsó jégkorszakot követő kolonizációs folyamatok során alakulhattak ki. A dunai vérvonal a Duna vízgyűjtő területére jellemző evolúciós vonal, így a Magyarország területén eredő patakok őshonos pisztráng állományai is a dunai vérvonalba tartozhatnak, azonban az európai állományok intenzív kutatásának ellenére a hazai, vad állományok genetikai vizsgálatát ez idáig nem végezték el. Európában, több országban is leírták a vonalak antropogén eredetű hibridizációját, az idegen gének izoláció híján történő keveredését, ami egyre inkább veszélyezteti az őshonos állományok fennmaradását. Az antropogén folyamatok visszaszorítása és a helyi kis populációk védelme egyre fontosabbá vált Európa-szerte. Számos kezdeményezés indult a földrajzilag jellemző vonalak

megőrzésére, az idegen vonalak betelepítésének megszüntetésével és a helyi vonal markerekre alapozott tenyésztésével.

Ezek alapján célul tűztem ki a hazai természetes sebespisztráng-populációk és tenyészállományok populációgenetikai állapotának felmérését, illetve az állományok genetikai összetételének, evolúciós vonalának vizsgálatát. Ehhez, a faj vizsgálatában széleskörűen alkalmazott mitokondriális és sejtmagi PCR-RFLP, valamint mikroszatellit markereket választottam, melyek alkalmasak a fő evolúciós vonalak elkülönítésére és a populációk genetikai összetételének jellemzésére is. Az állományok további jellemzésére, egy, a lazacfélékben konzervatív ivardeterminációs gén vizsgálatát is tervbe vettem. Végezetül az alkalmazott markeret felhasználva, az őshonos vonal arányának növelésére a hazai tenyészállományokban egy genetikai markerekre alapozott tenyésztési rendszer kialakítását is célul tűztem ki.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Helyszínek és mintavétel

Mintagyűjtésre a Duna hazai vízgyűjtőjén és Szerbiában, összesen 10 populációból, 888 egyedről vettem farokúszó-, vagy farok alatti úszó-mintát (**1. táblázat**). A lillafüredi állományban 2011-ben 401 egyedet mintáztam, majd vérfrissítés céljából 2013-ban további 243 egyed érkezett a gazdaságba, amikből szintén mintát vettem, ezeket külön populációként tartottam számon. A természetes populációk telepítési és halászati történelme változó vagy ismeretlen. Kontrollként a szerb Panjica-patak, egy földrajzilag izolált és történelmileg tisztán dunai vérvonalú populációját használtam. A későbbi beazonosíthatóság miatt a lillafüredi tenyészállományok egyedeit egyedei jellel (PIT: Passive Integrated Transponder) láttam el. DNS izolálásig a begyűjtött farokúszó mintákat -20°C-on tömény etanolban tároltam.

1. táblázat: A vizsgált sebespisztráng-populációk adatai. N: A mintázott és a mikroszatellit és PCR-RFLP markerekkel vizsgált egyedek száma; N_{szek}: A mitokondriális kontroll régió szekevenálásával vizsgált egyedek száma.

Populáció	Jelölés	Típus	N	N _{szek}	Mintázás éve	Mintázás koordinátái
Lillafüred 1.	LF1	Tenyész-állomány	401	41	2011	N48°07'03" E20°34'07"
Lillafüred 2.	LF2	Tenyész-állomány	243	26	2013	N48°07'03" E20°34'07"
Szilvásvárad	SZV	Tenyész-állomány	75	27	2014	N48°04'55" E20°24'25"
Bán	BA	Vad	25	12	2012	N48°08'35" E20°28'21"
Jósva	JO	Vad	33	16	2012	N48°28'56" E20°32'49"
Kemence	KE	Vad	24	20	2012	N47°59'32" E18°57'36"
Apátkúti	AK	Vad	50	28	2013	N47°44'53" E18°59'40"
Kölöntés	KO	Vad	14	14	2013	N47°22'17" E18°59'40"
Bittva	BI	Vad	9	9	2014	N47°13'19" E17°33'21"
Panjica (Serbia)	SRB	Vad	14	12	2014	N43°39'34" E20°04'20"
Összes (db)	10		888	205		

2.2. DNS izolálás

A szövetmintákból E.Z.N.A. Tissue DNA Spin izoláló kittel (Omega Biotek, VWR) a gyártó utasításait követve végeztem el a DNS kinyerést. Az izolált DNS mennyiségét spektrofotométerrel, a minőségét agaróz gél elektroforézissel (1% agaróz, 1×TBE-puffer, 0,5 µg/ml etídium-bromid) határoztam meg. A markereket polimeráz láncreakcióval mutattam ki, amihez minden minta koncentrációját 50 ng/µl-re állítottam be a nanofotométerrel mért koncentrációk alapján.

2.3. Sebes pisztráng populációk ivararányának vizsgálata

A sebes pisztráng állományok ivari megoszlását a lazacfélék Y kromoszómáján található ivar-specifikus markerrel (*sdY*) vizsgáltam (Yano et al., 2013). A marker optimalizálásához és pozitív kontrollként a lillafüredi telepen további 60 piaci méretű egyedét boncoltam fel. Az *sdY* markerhez használt primert a **2. táblázat** tartalmazza. A reakciót 25 µl végtérfogatban 2720 Thermo cycler gépben (Applied Biosystems) végeztem el: 1×PCR puffer (NH₄)₂SO₄ (ThermoFisher Scientific), 200 µM dNTP mix (ThermoFisher Scientific), 132 µM forward és reverse primer, 1,5 mM MgCl₂ (ThermoFisher Scientific), 0,04 U/µl Taq-polimeráz (ThermoFisher Scientific) és 100 ng templát DNS. A reakció hőprofilja: 3 perc 94 °C, majd 40 cikluson keresztül 30 másodperc 94 °C, 30 másodperc 60 °C és 30 másodperc 72 °C, végül 5 perc 72 °C. A reakció eredményét agaróz gél elektroforézissel (1% agaróz, 1×TBE-puffer, 0,5 µg/ml etídium-bromid) határoztam meg.

2.4. Sebes pisztráng populációk vizsgálata mitokondriális és sejtmagi genom szintjén

Három, a sebes pisztráng vérvonalainak elkülönítésére alkalmas PCR-RFLP markert használtam az egyedek vérvonal szerinti besorolására. Ezen felül a populációk genetikai diverzitását további öt, pisztráng-specifikus mikroszatellit markerrel mértem fel. Az alkalmazott markereket a **2. táblázat** összegzi.

2. táblázat: Alkalmazott molekuláris genetikai markerek. PCR-RFLP markerek esetében a restriktions enzimeket, mikroszatellit markerek esetében a primerhez kapcsolt festéket tüntettem fel a táblázatban.

Marker	Típus	Primerek	Enzim/ Festék	Referencia
CR mtDNS	Mitokondriális PCR-RFLP és szekvenálás	F: 28RIBa: CACCCTTAAC TCCCAAAGCTAAG R: HN20: GTGTTATGCTTTAGTTAAGC	Fnu4HI	Bernatchez & Danzmann 1993; Sušnik et al. 2001
LDH	Sejtmagi PCR-RFLP	F: GGCAGCCTCTTCCTCAAACGCCCAA R: CAACCTGCTCTCTCCCTCCTGCTGACGAA	BsII	McMeel et al. 2001

Marker	Típus	Primerek	Enzim/ Festék	Referencia
SL	Sejtmagi PCR-RFLP	F: TGGCCCGTTGAATCCATATAAAG R: ACTGTGAAACACTAAGCTCTCCA	MspI	Ford 1998
BFRO002	Mikroszatellit	F: ATGTTTTTGGACTGCACTATGTATTG R: GGAGATAAGAGTCAACGAGGC	NED	Sušnik et al. 1997
OMM1064	Mikroszatellit	F: AGAATGCTACTGGTGGCTGTATTGTGA R: TCTGAAAGACAGGTGGATGGTTCC	VIC	Rexroad et al. 2002
Ssa408uos	Mikroszatellit	F: AATGGATTACGGGTACGTTAGACA R: CTCTTGTGCAGGTTCTTCATCTGT	PET	Carney et al. 2000
SsoSL417	Mikroszatellit	F: TTGTTCAAGTGTATATGTGTCCCAT R: GATCTTCACTGCCACCTTATGACC	FAM	Slettan et al. 1995
SsoSL438	Mikroszatellit	F: GACAACACACAACCAAGGCAC R: TTATGCTAGGTCTTTATGCATTGT	FAM	Slettan et al. 1996
sdY	Ivar-specifikus (Y kromoszóma)	F: ATGGCTGACAGAGAGGCCAGAATCCAA R: CTAAAACCACTCCACCCTCCAT	-	Yano et al. 2013

2.4.1. PCR-RFLP markerek

A mitokondriális DNS kontroll régiójában egy lókuszt (CR mtDNS), a sejtmagi genomban további két lókuszt vizsáltam (a tejsav-dehidrogenáz (LDH), és a szomatolaktin (SL) génben PCR-RFLP módszerrel (**2. táblázat**). A reakciókat 25 µl végtérfogatban 2720 Thermo cycler gépben végeztem el: 1×PCR puffer (NH₄)₂SO₄, 200 µM dNTP mix, 264 µM forward és reverse primer, 1,5 mM MgCl₂ és 0,04 U/µl Taq-polimeráz. Az LDH és SL markerek kimutatásához 200 ng, a CR mtDNS marker esetén 250 ng templát DNS-t adtam a reakcióhoz. Az SL lókuszt esetében további 0,5 mM MgCl₂ oldattal, a CR mtDNS lókuszt esetében 625 ng/ml BSA (ThermoFisher Scientific) oldattal egészítettem ki a reakciót. A reakciók hőprofilja: 3 perc 94 °C, majd 40 cikluson keresztül 1 perc 94 °C, 1 perc 50 °C (CR mtDNS és SL) vagy 58 °C (LDH), és 1 perc 72 °C, végül 5 perc 72 °C. A reakciók eredményét agaróz gélelektroforézissel (1% agaróz, 1×TBE-puffer, 0,5 µg/ml etídium-bromid) határoztam meg. A PCR termékeket a **2. táblázatban** található restrikciós endonukleázzal emésztettem 37 (CR mtDNS, SL) vagy 55 °C-on (LDH) 8 órán keresztül 10 µl végtérfogatban az alábbi összetételben: 5 µl PCR-termék, 1× enzim-puffer, 2 U enzim. A reakciók eredményét agaróz gélelektroforézissel (2% agaróz, 1× TBE-puffer, 0,5 µg/ml etídium-bromid) határoztam meg. Az egyes vonalakra jellemző nukleotid polimorfizmusok alapján különítettem el a vizsgált gének különböző haplotípusait vagy alléljait (**3. táblázat**). A CR mtDNS és az LDH marker esetében, a restrikciós endonukleázzal végzett emésztés során az atlanti vonalat tartalmazó mintákban két-két fragment jön létre, míg a dunai változatú minták esetében hasítás nélkül az eredeti PCR-termék marad meg. Az SL marker esetén az endonukleáz végzett emésztés után az

atlanti vonalban két fragment, míg a dunai vonalban három fragment figyelhető meg. Mivel az LDH és SL lókuszok a sejtmagi genomban találhatóak, így két-két alléllal rendelkeznek, míg a mitokondriális DNS anyai öröklődés menetéből adódóan csak egy allél található az adott lókuszon.

3. táblázat: Alkalmazott PCR-RFLP és mikroszatellit markerek alléljainak evolúciós vonal szerinti csoportosítása irodalmi adatok alapján.

Marker	Dunai allélméret (bp)	Atlanti allélméret (bp)	Egyéb allélméret (bp)	Referencia
CR mtDNS	1088	654 és 434	-	Bernatchez & Danzmann 1993; Sušnik et al. 2001
LDH	428	353 és 75	-	McMeel et al. 2001; Marić et al. 2010
SL	396, 317 és 189	713 és 189	-	Ford 1998; Snoj et al. 2010
BFRO002	122-126	116-118	120	Sušnik et al. 1997; Jug et al. 2005
OMM1064	173-282	172-261	178, 204	Rexroad et al., 2002; Lerceteau-Köhler & Weiss 2006; Bogataj 2010
Ssa408uos	231-282	211-227	219, 233, 235, 239, 243, 255, 258	Carney et al., 2000; Lerceteau-Köhler & Weiss 2006; Bogataj 2010
SsoSL417	158, 169, 179, 194	173, 175, 190, 191, 197	177, 181, 184	Slettan et al., 1995; Lerceteau-Köhler & Weiss 2006; Bogataj 2010
SsoSL438	97, 99, 105	95, 103, 108, 110	101, 106	Slettan et al., 1996; Lerceteau-Köhler & Weiss 2006; Bogataj 2010

2.4.2. Mitokondriális genom szekvenálás

A populációk összehasonlítását a mitokondriális DNS kontroll régiójának PCR-RFLP vizsgálata mellett a CR mtDNS haplotípusainak analízisével egészítettem ki. Minden populációból a minták minimum 10 %-án végeztem el a szekvencia analízist. A CR mtDNS PCR során kapott termékek tisztítását 0,5 U Sap és 1,1 U ExoI enzim alkalmazásával végeztem el. A szekvenáló reakciót a tisztított PCR terméken BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) használatával hajtottam végre 10 µl végtérfogatban: 1×BigDye puffer, 132 µM 28RIBa vagy HN20 primer, 1 µl BigDye, 1-7 µl PCR termék. A reakció hőprofilja: 28× 96°C 10 másodperc, 50°C 5 másodperc és 60°C 4 perc. A reakció terméket nátrium-acetátos-etanolos eljárással csaptam ki, majd a felülúszó eltávolítása után a csapadékot kiszárítottam és a mintákat HiDi formamide-ban (Applied Biosystems) oldottam. A mixet legkevesebb 10 órás inkubációt követően 96°C-on 6 percig Thermal Cycler készülékben denaturáltam. A kapilláris gélelektroforézist 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) gépen hajtottam végre POP7

polimer (Applied Biosystems) alkalmazásával. Az eredmények megbízhatósága végett a szekvenálást többször is elvégeztem.

2.4.3. Mikroszatellit markerek

A populációk további jellemzésére öt, lazacfélékben gyakran alkalmazott mikroszatellit markert választottam (**2. táblázat**). A BFRO002, OMM1064, Ssa408uos és SsoSL417 lókuszok vizsgálatához a reakciót 25 µl végtérfogatban az alábbi összetétellel végeztem el: 1×Taq-polimeráz puffer (NH₄)₂SO₄-tartalmú, 264 µM forward és reverse primer, 200 µM dNTP mix, 1,5 mM MgCl₂ és 0,04 U/µl Taq-polimeráz és 200 ng templát DNS. A reakciók hőprofilja: 3 perc 94°C, majd 35× 94°C 45 másodperc, 57°C 60 másodperc (BFRO002, SsoSL417 lókuszok esetén) vagy 90 másodperc (OMM1064, Ssa408uos lókuszok esetén) végül 72°C 60 másodperc, a ciklusokat követően végül 5 perc 72°C-on. Az SsoSL438 lókuszt szintén 25 µl reakciótérfogatban vizsgáltam: 1× Taq-polimeráz puffer (NH₄)₂SO₄-tartalmú, 132 µM forward és reverse primer, 200 µM dNTP mix, 2 mM MgCl₂ és 0,06 U/µl Taq-polimeráz és 100 ng templát DNS. A reakció hőprofilja: 3 perc 94°C, majd 35× 94°C 40 másodperc, 50°C 40 másodperc és 72°C 40 másodperc, a ciklusokat követően végül 5 perc 72°C-on.

A markerek bázispár pontosságú méret-meghatározásához az fragmentek 5'-végére fluoreszcens jelölést építettünk be. Az SsoSL438 lókusz esetében a PCR reakcióban alkalmazott reverse primert láttuk el 5' FAM fluoreszcens jelöléssel (direkt jelölt primer). A BFRO002, OMM1064, Ssa408uos és SsoSL417 lókuszok vizsgálata során a forward primert hosszabbítottuk meg egy 17 bp hosszúságú, a vizsgált fajra nem specifikus szakasszal (tail: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'). A PCR reakcióhoz egy, a tail szakasszal komplementer harmadik, 5' végén fluoreszcens festékkel (PET, FAM, VIC vagy NED) jelölt primert (tail primer) adtam 264 µM mennyiségben (Shimizu et al., 2002). A PCR során az fragmentek végére kerül a jelölést hordozó oligonukleotid. A reakciók eredményét agaróz gélelektroforézissel (2% agaróz, 1×TBE-puffer, 0,5 µg/ml etídium-bromid) ellenőriztem le, majd a sikeres reakciókat fragmentanalízisre készítettem elő az alábbi összetételben: 0,5 µl FAM/NED/PET vagy VIC fluoreszcens festékkel jelölt PCR-termék, 0,2 µl GeneScan 500 LIZ molekulásúly marker (Applied Biosystems) és 9,8 µl HiDi Formamide. A mixet 94°C-on 6 percig Thermal Cycler készülékben denaturáltam. A fragmentanalízist ABI 3130 típusú gépen hajtottam végre POP7 polimer alkalmazásával. A fragmentanalízis során kapott nyers adatokat GENEMAPPER SOFTWARE VER. 4.0 (Applied Biosystems) program segítségével dolgoztam, majd a bázispár pontosságú fragment méreteket EXCEL (Microsoft) programban rögzítettem és készítettem elő a populáció genetikai számításokhoz.

2.4.4. Populációgenetikai és a markerek jellemzéséhez használt szoftverek

2.4.4.1. A mitokondriális genom variabilitása és network analízise

A CR mtDNS szekvenciák megjelenítését és kiértékelését MEGA 5 (Tamura et al., 2011) szoftverrel végeztem. Az evolúciós különbségek kiszámításához a szekvenciákat az NCBI adatbázisban található egy dunai (AY185568) és egy atlanti (AY185577) vérvonalú referencia szekvenciához viszonyítottam Tamura-3 paraméteres modell (Tamura, 1992) használatával. A populációk további jellemzésére a mitokondriális DNS kontroll régió haplotípus (Hd) és nukleotid diverzitás (π) mutatóit DnaSP 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009) szoftverrel számoltam ki, majd a network analízist a haplotípus diverzitás adatok alapján NETWORK 4.1.1.2 (Bandelt et al., 1999) szoftverrel median joining algoritmus használatával végeztem el.

2.4.4.2. A sejtmagi genom populációgenetikai analízise

A sejtmagi PCR-RFLP és mikroszatellit lókuszok allélméretei alapján végeztem el az állományok általános populációgenetikai elemzését. Az átlagos (N_a) és effektív allélszámot (N_{eff}), illetve a várt (H_e) és megfigyelt (H_o) heterozigotizás értékeket GeneALEX 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) szoftverrel számoltam ki lókuszonként és populációnként egyaránt. A mikroszatellit markerek esetében előforduló egyedi allélok kimutatására és a populációk közti molekuláris variancia hierarchikus analízisére (AMOVA) szintén ezt a szoftvert alkalmaztam. A markerek allélgazdagságát (A_r), az állományok F_{IS} - (a genetikai variancia populáción belüli komponense) és F_{ST} -értékét (a genetikai variancia populációk közötti komponense), valamint a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérést FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001) szoftver segítségével számoltam ki. A többszörös összehasonlítás szignifikancia szintjét sorozatos Bonferroni korrekcióval (Rice, 1989) becsültem meg.

A mikroszatellit lókuszok polimorf információs tartalom (PIC) értékét MICROSATELLITE TOOLKIT VER. 3.1.1 (Park, 2001) EXCEL bővítmény segítségével határoztam meg. Null-allél jelenlétét, azaz egy allél kiesésének vagy a genotipizálási hibák valószínűségének becsülését MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) szoftverrel vizsgáltam. A Nei-féle genetikai távolság (Da-távolság (Nei et al., 1983)) kiszámítására a POPULATIONS (Langella, 2002) szoftvert használtam, majd a törzsfa szerkesztését a FIGTREE VER. 1.3.1 (Rambaut, 2009) programmal végeztem el. Az egyedek mikroszatellit alléljai alapján a teljes vizsgált állomány szerkezetét (földrajzi információk felhasználása nélkül) STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) szoftverrel. A lehetséges klaszter megoszlást $K=1$ és $K=12$ között vizsgáltam, majd a legvalószínűbb genetikai klaszter számát az egyes K -értékek valószínűségi analízise alapján határoztam meg STRUCTURE Harvester (Earl & vonHoldt, 2012; Evanno et al., 2005) használatával. Szintén a mikroszatellit allélok eredményei alapján R environment adeqnet 2.0.1.

package (Jombart et al., 2008) segítségével ábrázoltuk a populációk közti genetikai variancia főkomponens analízisét (principal component analysis, PCA).

2.5. Genetikai markerekre alapozott tenyésztési rendszer kialakítása és F1 generáció létrehozása

A dunai vérvonal feldúsítása céljából a PCR-RFLP és a mikroszatellit lókuszek allélméretei alapján pontozási rendszert hoztam létre a lillafüredi tenyészállományban. Irodalmi adatok alapján (Sušnik et al. 1997; Jug et al. 2005; Lerceteau-Köhler & Weiss 2006; Bogataj 2010) a mikroszatellit lókuszek alléljait dunai, atlanti és egyéb csoportba soroltam (**3. táblázat**). Az OMM1064 lókuszek esetén az átfedő mérettartományába eső allélok szintén a korábbi tanulmányok alapján az egyik vonalra jellemző allélként, egyéb esetben új/egyéb allékként kezeltem. Az egyedek a dunai vérvonalhoz tartozó sejtmagi allélokért egy-egy pontot, az anyai öröklődésű mitokondriális DNS marker esetében csak az ikrás egyedek tíz pontot kaptak, illetve a ritka allélok (amik maximum ötször fordulnak elő a teljes populációban) szintén 1-1 pontot értek. Az egyedek pontszámát hozzárendeltem az egyedi azonosítójukhoz (**1. ábra**), így szaporításkor egy leolvasással el lehet dönteni, hogy az adott egyed mennyi dunai alléllal rendelkezik az általunk vizsgált lókuszek esetében. Ezzel a módszerrel végeztünk szaporítást a 2014 novemberében, majd az F1 generációból 31 egyedet megvizsgáltam ugyanazon lókuszekre.

1. ábra: Az alkalmazott markerek alapján kialakított pontozási rendszer és az egyedek azonosítójához rendelt pontszám (Genetikai azonosító) a tenyésztési rendszerben (részlet)

CR mtDNS	SL	LDH	BFRO 002	OMM 1064	Ssa 408uo s	SsoSL 417	SsoSL 438	Ivar	Dunai MT	Ritka allélok száma	Dunai allélok száma	Összes nukleáris dunai allél	Ikrás dunai mtDNA	Genetikai azonosító							
100	100	200	100	200	116	116	197	228	235	247	177	190	103	108	2	0	0	5	5	0	L260_5
100	100	200	100	200	116	120	172	228	205	250	175	177	103	105		0	0	5	5	0	L262_5
100	100	100	100	200	116	120	232	267	235	247	173	175	97	105		0	0	4	4	0	L263_4
100	100	100	100	100	116	116	247	247	235	235	181	177	97	105		0	0	2	2	0	L264_2
100	100	100	100	100	116	120	197	228	219	227	177	177	103	105	2	0	0	2	2	0	L265_2
100	100	100	100	100	116	116	176	178	250	235	190	181	97	105	1	0	0	1	1	0	L266_1
100	100	100	100	100	116	116	172	197	211	219	173	181	105	105	1	0	0	0	0	0	L267_0
100	100	200	100	100	120	120	172	227	227	247	177	177	103	106		0	0	6	6	0	L268_6
100	100	200	100	100	116	120	172	208	258	258	175	190	103	103		0	0	5	5	0	L269_5
100	100	100	200	200	116	120	197	228	219	227	175	177	103	105		0	0	4	4	0	L27_4
100	100	100	100	100	116	116	267	288	215	235	173	181	105	105		0	0	1	1	0	L270_1
100	100	200	100	100	116	116	232	247	223	227	175	175	103	105		0	0	3	3	0	L271_3
100	100	100	200	200	116	116	208	267	223	235	188	190	105	108	2	0	0	5	5	0	L272_5
100	100	100	200	200	116	116	243	267	205	235	177	188	97	99		0	0	4	4	0	L273_4
100	100	200	200	200	113	120	208	261	247	258	173	173	97	103	1	0	0	7	7	0	L274_7
100	100	100	100	100	116	120	172	172	219	235	181	188	97	99	2	0	0	1	1	0	L275_1
100	100	200	200	200	116	116	197	232	239	247	177	190	103	105		0	0	5	5	0	L276_5
100	100	200	200	200	116	120	232	243	205	258	175	175	103	103		0	0	7	7	0	L277_7
100	100	200	100	200	116	116	172	179	205	235	188	188	99	103		0	0	4	4	0	L278_4
100	100	200	100	200	116	116	208	267	235	247	181	188	97	99	1	0	0	5	5	0	L279_5
100	100	100	100	200	116	116	172	261	239	247	177	181	103	103	2	0	0	4	4	0	L28_4
100	100	100	100	200	119	113	164	176	219	239	173	177	97	105	1	0	1	1	2	0	L280_2
100	100	200	100	100	116	120	188	172	219	235	179	188	97	99	1	0	1	3	4	0	L281_4
100	100	200	200	200	120	120	178	208	205	258	175	177	103	103		0	0	8	8	0	L282_8
100	100	100	100	200	116	116	208	261	239	247	173	175	103	105		0	0	4	4	0	L283_4
100	100	100	100	100	116	120	232	261	219	227	175	177	103	105	2	0	0	2	2	0	L284_2
100	100	200	100	200	116	116	182	227	227	247	175	190	103	105		0	0	5	5	0	L285_5
100	100	100	100	200	116	120	168	182	205	247	173	181	97	103	1	0	0	4	4	0	L286_4
100	100	100	100	200	116	116	172	172	219	235	181	188	97	99		0	0	1	1	0	L287_1
100	100	200	100	200	116	116	197	208	219	250	177	177	97	105		0	0	4	4	0	L289_4

3. EREDMÉNYEK

3.1. Ivar megoszlása a vizsgált sebes pisztráng populációkban

A boncolt halakból vett szövetminták segítségével az *sdY* markert optimalizáltam a hazai sebes pisztráng állományok ivari vizsgálatához. A marker elemzését az LF1 állomány kivételével mindegyik egyeden (összesen 487 db) elvégeztem. Az eredmények alapján az ivarok aránya 50% körüli az LF2 és az SZV tenyészállományokban, illetve a Kemence-patakban, míg a többi vad állományban a női egyedek aránya kevesebb volt, mint 50% (**4. táblázat**).

4. táblázat: Ikrás egyedek és dunai haplo-, és genotípussal rendelkező sebes pisztrángok aránya a vizsgált populációkban. Az ivararányt az *sdY* marker, a dunai vonal arányát a PCR-RFLP markerek alapján állapítottam meg. A hazai állományokon belüli minimum és maximum értékeket kiemeltem. N: mintaszám, Nf: Ikrás egyedek aránya, CR mtDNS: Dunai mitokondriális haplotípussal rendelkező egyedek aránya, Nf CR-da: Dunai mitokondriális haplotípussal rendelkező ikrás egyedek aránya az összes vizsgált egyed közt, LDH-da: Dunai LDH alléllal rendelkező egyedek aránya, SL-da: Dunai SL alléllal rendelkező egyedek aránya, n.a.: nincs adat.

Populáció	N	Nf (%)	CR mtDNS (%)	Nf CR-da (%)	LDH-da (%)	SL-da (%)
LF1	401	n.a.	0,25	0,0	37,0	22,1
LF2	243	49,0	49,2	25,9	9,9	33,9
SZV	75	51,0	22,7	9,3	21,3	22,7
BA	25	26,1	8,7	4,4	31,3	34,1
JO	33	36,4	9,1	3,0	10,6	17,2
KE	24	50,0	4,2	0,0	41,7	29,2
AK	50	44,0	34,0	16,0	19,0	18,0
KO	14	35,7	64,3	28,6	42,9	3,6
BI	9	22,2	0,0	0,0	22,2	0,0
SRB	14	42,9	100,0	42,9	100,0	100,0

3.2. Sebes pisztráng vérvonalak aránya a vizsgált populációkban

3.2.1. Mitokondriális DNS variáciája

A mitokondriális DNS kontroll régiójának PCR-RFLP alapú vizsgálata igazolta a szerb kontroll populáció tiszta dunai eredetét ezen a lókuszon, azonban minden magyarországi populáció esetén az atlanti vonal jelenlétét, sőt a legtöbb hazai állományban az atlanti vonal túlsúlyát tapasztaltam (51-100%). Ez alól kivétel a Kölöntés-patak, ahol az egyedek 64%-ában találtam dunai haplotípust. A mitokondriális DNS öröklődése kizárólag a női ivarhoz kötött, az összes egyed közt

a dunai haplotípussal rendelkező ikrások aránya 0-29% közt változott a hazai populációkban, legmagasabb mennyiségben a Kölöntés-patakban (KO, 28,6%) és az LF2 tenyészállományban (25,9%) figyelhető meg, míg a Kemence- és Bittva-patak esetén, illetve az LF1 tenyészállományban egy dunai mitokondriális haplotípust hordozó ikrás egyed sem találtam (**4. táblázat**).

A CR mtDNS szekvenciaanalízise során összesen 205 egyed mitokondriális kontroll régiójának 753 bázispár hosszúságú szakasztát hasonlítottam össze. Az illesztés során 11 polimorf helyet és 9 különböző haplotípust azonosítottam (**5. táblázat**). A leírt haplotípusok szekvenciái MG751088 - MG751096 azonosítószámmal elérhetőek az NCBI adatbázisában. Az NCBI Nucleotide adatbázisában tárolt sebes pisztráng haplotípusok alapján az általam azonosított változatok közül három az atlanti, hat pedig a dunai vonalhoz tartozik.

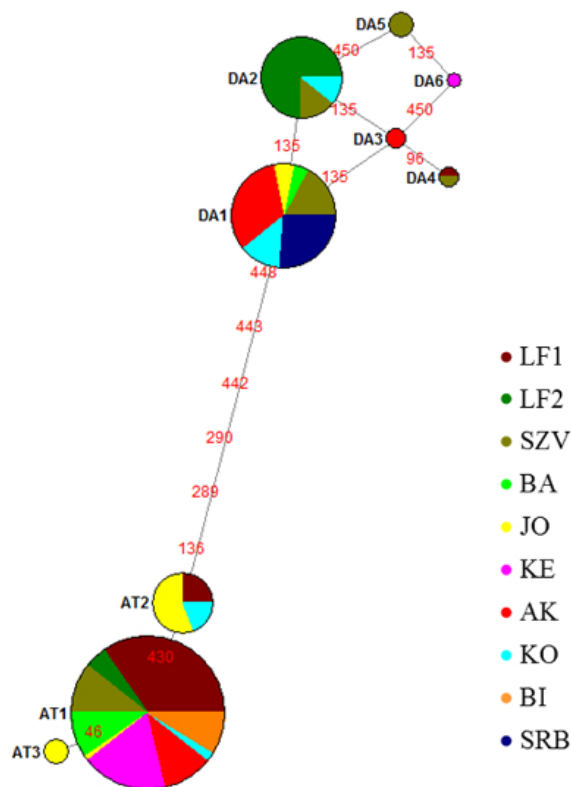
5. táblázat: A különböző CR mtDNS haplotípusok közötti nukleotid eltérések és pozíciójuk.

Da: dunai haplotípus; At: Atlanti haplotípus.

Nukleotid pozíció (bp)	46	96	135	136	289	290	430	442	443	448	450
Da1	G	A	A	G	T	C	C	A	C	T	T
Da2	.	.	T
Da3	.	.	G
Da4	.	C	G
Da5	.	.	T	C
Da6	.	.	G	C
At1	.	.	.	T	C	T	T	G	G	C	.
At2	.	.	.	T	C	T	.	G	G	C	.
At3	A	.	.	T	C	T	T	G	G	C	.

A haplotípus diverzitások alapján készített median-joining network analízis két fő haplocsoportot különített el: az atlantit és a dunait (**2. ábra**). Az atlanti csoport tartalmazza az összes atlanti, míg a dunai az összes dunai haplotípust. A PCR-RFLP és a szekvenciaelemzések eredményei között egyik egyednél sem volt ellentmondás. A Kemence-patak egyetlen egyedében talált Da6 haplotípust ezidáig nem írták le másik populációkban, azonban a network analízis alapján szintén a dunai csoportba sorolandó. A körök mérete a mintahalmazon belüli haplotípusok gyakoriságával, míg az egyes pontokat összekötő vonalak hossza a haplotípusok között lévő mutációs lépések számával arányos. A két csoportot 6 mutációs lépés választja el és a köztük lévő divergencia mértéke 0,0112. Az atlanti klaszteren belül az At2 és At3 haplotípus nem kapcsolódik egymáshoz közvetlenül, valószínűleg először az At2 haplotípus létezett, amiből kialakult az At1, majd az At3 variáció. A dunai klaszterben a Da1 haplotípusból ágaznak ki a Da2 és Da3 variációk, majd ezek ágaznak tovább a többi haplotípusra. Az újonnan talált Da6 haplotípus egy-egy

mutációs lépésre található a Da3 és Da5 haplotípusoktól, míg a többi haplotípustól két mutációs lépés választja el.



2. ábra: Median joining network analízis a vizsgált sebes pisztráng populációk CR mtDNS haplotípus diverzitása alapján. A piros számok a mutáció szekvencián belüli helyzetére utalnak, a körök mérete a mintahalmazon belüli haplotípusok gyakoriságát reprezentálja.

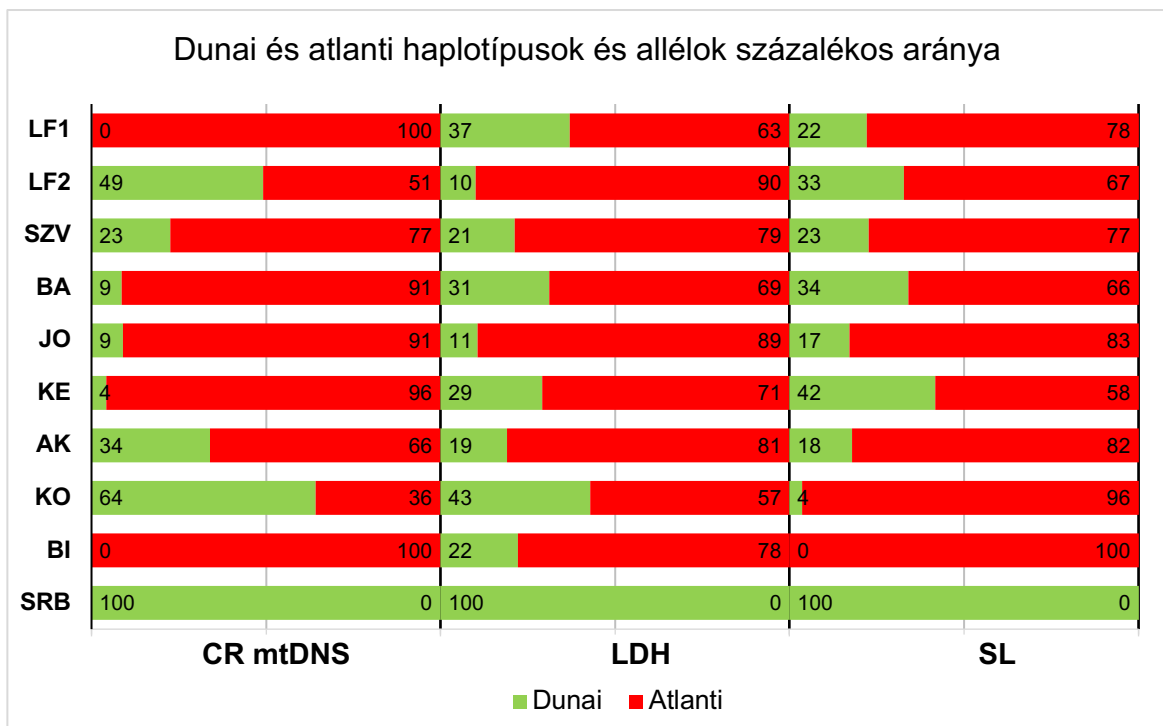
A szerb populációra jellemző Da1, a leggyakoribb dunai haplotípus, a szerben kívül a hazai vad populációkban és az szilvásváradai tenyészállományban sikerült kimutatni. A Da2 haplotípust csak három populációban, két tenyészállományban és a Kölöntés-patakban detektáltam. A Da3 változat csak az Apátkúti-patakra jellemző, míg a Da4 és a Da5 haplotípus csak a tenyészállományokban volt kimutatható. A leggyakoribb atlanti haplotípus (At1) a szerb kontroll kivételével minden populációban megjelent. Az At2 haplotípust az LF1 tenyészállományban és két vad populációban azonosítottam, míg az At3 haplotípus csak a Jósva-patakra volt jellemző. A szerb kontroll populációban és a Bittva-patakban csak egy-egy haplotípus jelent meg, így ezen állományok diverzitása 0, a többi populáció diverzitása 0,100 és 0,758 közt mozog. A teljes mintahalmaz haplotípus diverzitása (Hd) 0,67 és nukleotid diverzitása (π) 0,005 (**6. táblázat**). A mitokondriális DNS kontroll régiójának haplotípus vizsgálata és a network analízis feltárta a vonalak keveredését vagy az atlanti vonal túlsúlyát az összes hazai populációban, és különbséget mutatott ki az LF1 és LF2 tenyészállományok genetikai összetétele közt.

6. táblázat: Azonosított CR mtDNS haplotípusok száma a tenyésztett és vadon élő pisztrángállományokban. A táblázatban a legkorábban leírt és általam is azonosított haplotípusok NCBI azonosítója szerepel, illetve a vizsgálatom során újonnan leírt haplotípust (Da6, MG751095) vastag betűvel emeltem ki. N: minta mérete, Da: dunai haplotípusok; At: Atlanti haplotípusok; Hd: Haplotípus diverzitás; π : nukleotid diverzitás

Populáció	N	Da1	Da2	Da3	Da4	Da5	Da6	At1	At2	At3	Hd	π
		AY185568	AY185573	AY185570	HQ848372	HQ848373	MG751095	EF530480	EF530476	AY185577		
LF1	41				1			36	4		0,224	0,001
LF2	26		21					5			0,323	0,003
SZV	27	8	4		1	3		11			0,738	0,006
BA	12	2						10			0,303	0,003
JO	16	3						1	9	3	0,650	0,004
KE	20						1	19			0,100	0,001
AK	28	15		2				11			0,574	0,003
KO	14	6	3					2	3		0,758	0,005
BI	9							9			0,000	0,000
SRB	12	12									0,000	0,000
Összesen	205	46	28	2	2	3	1	104	16	3	0,670	0,005

3.2.2. Sejtmagi DNS varianciája

A sejtmagi genom vérvonal vizsgálatához az LDH és SL lókuszok PCR-RFLP analizisét végeztem el minden populációban. A CR mtDNS-hez hasonlóan ezek a lókuszok is igazolták a szerb kontroll populáció tiszta dunai eredetét, és jelentős különbségekkel, de minden magyarországi populáció esetén az atlanti vonal túlsúlyát tapasztaltam (LDH: 57-90%, SL: 66-100%) (4. táblázat és 3. ábra). Érdekeség, hogy a vad állományok közt a Bittva-patakban az SL és CR mtDNS lókusz esetén nem találtam dunai allélt, azonban az LDH lókusz esetén a dunai allélok aránya elérte a 22%-ot. A Kőöntés-patakban találtam a dunai allélok legnagyobb arányát az LDH (43%) és CR mtDNS (64%) lókuszokban, azonban az SL marker esetén a dunai allélok mennyisége nem éri el a 4%-ot. Jelentős különbségeket találtam a két lillafüredi tenyészállomány genetikai összetételében ezen lókuszok vizsgálata során is. A hazai állományok közt sem a mitokondriális, sem a sejtmagi PCR-RFLP lókuszok esetén nem találtam tisztán dunai egyedet.



3. ábra: Dunai és atlanti alléllal/haplotípussal rendelkező sebes pisztrángok aránya a vizsgált populációkban a három PCR-RFLP lókusz vizsgálata alapján

3.3. A sebes pisztráng állományok populációgenetikai állapota a sejtmagi markerek vizsgálata alapján

3.3.1. Az állományok populáción belüli genetikai diverzitása

A két allélos PCR-RFLP lókuszok alacsony és közepes polimorfizmust mutattak a vizsgált populációkban ($PIC=0,07-0,37$), illetve a szerb kontroll populációban és a Bittva-patakban

előforduló homozigóta egyedek miatt az SL és LDH lókuszok polimorf információs tartalma nulla. Ezzel szemben a mikroszatellit lókuszok különböző mértékű polimorfizmust mutattak. Az összes megjelenő allélszámot és a populációnkénti PIC értéket figyelembe véve, a kevés alléllal rendelkező BFRO002 mikroszatellit lókusz mérsékelt polimorfizmust mutatott (PIC=0,07-0,53), míg a többi mikroszatellit lókusz esetén nagymértékű polimorfizmust tapasztaltam minden populációban (átlag PIC=0,57-0,86). A legnagyobb PIC értékeket (0,95) az OMM1064 lókuszon mértem (**7. táblázat**).

A BFRO002 lókusz jellemző allélmérete 110-124 bp, az OMM1064 lókuszé 158-364 bp, az Ssa408uos lókuszé 208-309 bp, SsoSL417 lókuszé 161-194 bp és az SsoSL438 lókuszé 99-116 bp volt. Általánosságban a nagyobb mintaszámú állományok, nagyobb lókuszvarianciával rendelkeztek. Az egyes populációkra jellemző privát allélok minden állományban megjelentek. Változó gyakorisággal (0,001-0,332) összesen 42 privát allélt találtam, ami az összes allél 30%-a és ezek főként az OMM1064 és az Ssa408uos lókuszokhoz kapcsolódtak. A legtöbb (11 db) privát allélt a két lillafüredi tenyészállományban találtam, de a legnagyobb arányban az izoláltabb Bittva- (6-17%) és Kölöntés-patakban (23-32%) fordultak elő (**7. táblázat**).

7. táblázat: A mikroszatellit lókuszok egyes populációkra jellemző privát allélméretei (bp) és az adott populáción belüli gyakoriságuk (0-1 közti érték lehet, 1=100%)

Populáció	Lókusz	Allélméret	Gyakoriság	Populáció	Lókusz	Allélméret	Gyakoriság
LF1	BFRO002	110	0,004	SZV	OMM1064	331	0,007
		124	0,001			BI	OMM1064
	158	0,001	Ssa408uos	245	0,056		
	164	0,006	SsoSL417	196	0,056		
	216	0,003	JO	OMM1064	250	0,061	
	234	0,001			272	0,015	
	239	0,001			277	0,030	
	263	0,001			316	0,106	
	346	0,003			Ssa408uos	253	0,045
	SsoSL417	169	0,001	260	0,015		
SsoSL438	93	0,003	273	0,015			
97	0,162	KE	OMM1064	162	0,045		
LF2	OMM1064			186	0,123	AK	OMM1064
		225	0,009	224	0,052		
		286	0,003	KO	OMM1064	174	0,321
		296	0,003			Ssa408uos	289
		337	0,003	BA	OMM1064	252	0,020
	Ssa408uos	213	0,002			Ssa408uos	284
	225	0,007	SRB	OMM1064	206	0,036	
	269	0,002			Ssa408uos	309	0,250
	281	0,002					
	285	0,002					
303	0,002						

A vizsgált állományok populációgenetikai analízisének eredményei a **8. táblázat** tartalmazza. A két nukleáris PCR-RFLP lókuszt közös vizsgálat során az átlagos allélszám (N_{ma}) a homoizigóta szerb kontroll populáció kivételével minden állományban 2 volt. A minta méretétől függő allélgazdagság (A_r) értéke 1,000 és 2,000 között mozgott az egyes populációkban, míg az allélgazdagsággal korrigált effektív allélszám (N_{eff}) értéke 1,000 és 1,825 között változott. A legmagasabb várt ($H_e=0,459$) és tényleges ($H_o=0,708$) heterozigotizációs értékeket a Kemence-patakban mértem, ahol a populáción belüli variancia komponens értéke ($F_{is}=-0,561$) is nagymértékű heterozigotizációra utalt. A Kemence-patak mellett még az LF1 állományban tapasztaltam a Hardy-Weinberg egyensúlytól való szignifikáns eltérést ($p<0,01$), ami mindkét esetben az SL lókuszon mért heterozigóta többletből eredt.

A mikroszatellit lókuszon mért átlagos allélszámok 3,75 és 18,60, az allélgazdagság értékei 4,805 és 7,276, illetve az effektív allélszámok 2,118 és 7,446 között mozogtak a közös analízis során. Mindhárom mutató esetén a legalacsonyabb értékeket a szerb kontroll populáció mellett a hazai Bittva-patakban tapasztaltam, ami az alacsonyabb egyedesszámmal magyarázható. A mikroszatellit lókuszt összevont elemzése alapján mindegyik vizsgált populáció Hardy-Weinberg egyensúlyban van, azonban a lókuszt külön vizsgálva heterozigóta többletet mértem az LF2 (BFRO002, $F_{is}=-0,111$, $p<0,05$, Ssa408uos, $F_{is}=-0,070$, $p<0,001$) állományban, illetve heterozigóta hiányt tapasztaltam a Jósua-patak (BFRO002, $F_{is}=0,377$, $p<0,05$) és az LF1 (SsoSL417, $F_{is}=0,083$, $p<0,01$) állomány esetén. Ezzel összefüggően, a null allélok valószínűségét csak az LF1 populációban, az SsoSL417 lókuszt esetén mutattam ki.

8. táblázat: A vizsgált sebes pisztráng állományok populációgenetikai elemzése a két nukleáris PCR-RFLP és öt mikroszatellit (MS) lókuszt alkalmazásával. N: mintaszám, N_{ma} : átlagos allélszám, N_{eff} : effektív allélszám, A_r : Allél gazdagság, H_e : várt heterozigotizáció, H_o : megfigyelt heterozigotizáció, F_{is} : beltenyésztettség koefficiens, HWE: Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés szignifikanciája, NA=nincs adat, ns=nem szignifikáns, ** $p<0,01$; *** $p<0,001$)

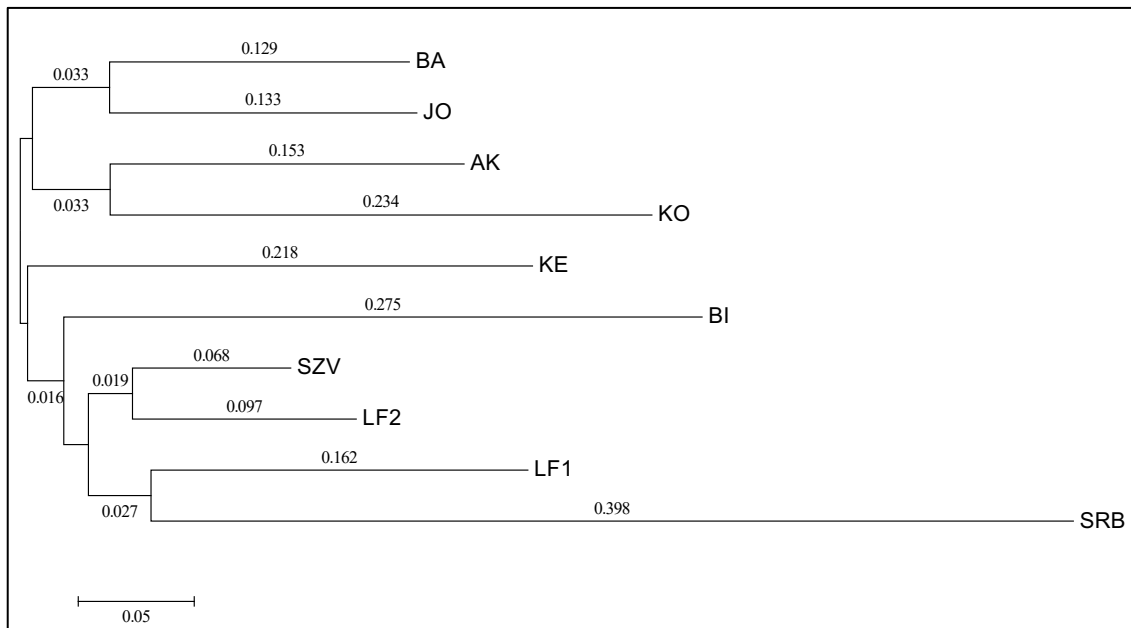
Populáció	N	Marker	N_{ma}	N_{eff}	A_r	H_e	H_o	F_{is}	HWE
LF 1	401	PCR-RFLP	2	1,699	1,995	0,406	0,441	-0,088	**
		MS lókuszt	16,20	6,917	6,901	0,772	0,783	-0,014	ns
LF 2	243	PCR-RFLP	2	1,515	1,927	0,314	0,306	0,026	ns
		MS lókuszt	18,60	7,004	6,848	0,740	0,781	-0,055	ns
SZV	75	PCR-RFLP	2	1,523	1,992	0,345	0,373	-0,081	ns
		MS lókuszt	10,25	6,271	7,276	0,762	0,765	-0,003	ns
BA	25	PCR-RFLP	2	1,785	2,000	0,449	0,521	-0,163	ns
		MS lókuszt	10,50	7,145	7,102	0,812	0,884	-0,091	ns

Populáció	N	Marker	Nma	Neff	Ar	He	Ho	F _{is}	HWE
JO	33	PCR-RFLP	2	1,316	1,944	0,241	0,277	-0,157	ns
		MS lókusz	12,25	7,446	6,866	0,691	0,680	0,016	ns
KE	24	PCR-RFLP	2	1,825	2,000	0,459	0,708	-0,561	***
		MS lókusz	6,75	3,764	4,815	0,685	0,692	-0,010	ns
AK	50	PCR-RFLP	2	1,432	1,983	0,305	0,290	0,048	ns
		MS lókusz	8,25	4,841	5,613	0,676	0,671	0,007	ns
KO	14	PCR-RFLP	2	1,517	1,882	0,290	0,321	-0,114	ns
		MS lókusz	5,75	3,993	5,772	0,629	0,685	-0,093	ns
BI	9	PCR-RFLP	1,5	1,264	1,500	0,183	0,222	-0,231	ns
		MS lókusz	4,75	3,415	5,000	0,732	0,711	0,030	ns
SRB	14	PCR-RFLP	1	1,000	1,000	0,000	0,000	NA	NA
		MS lókusz	3,75	2,118	4,805	0,565	0,571	-0,012	ns

3.3.2. A vizsgált populációk közti genetikai diverzitás mértéke

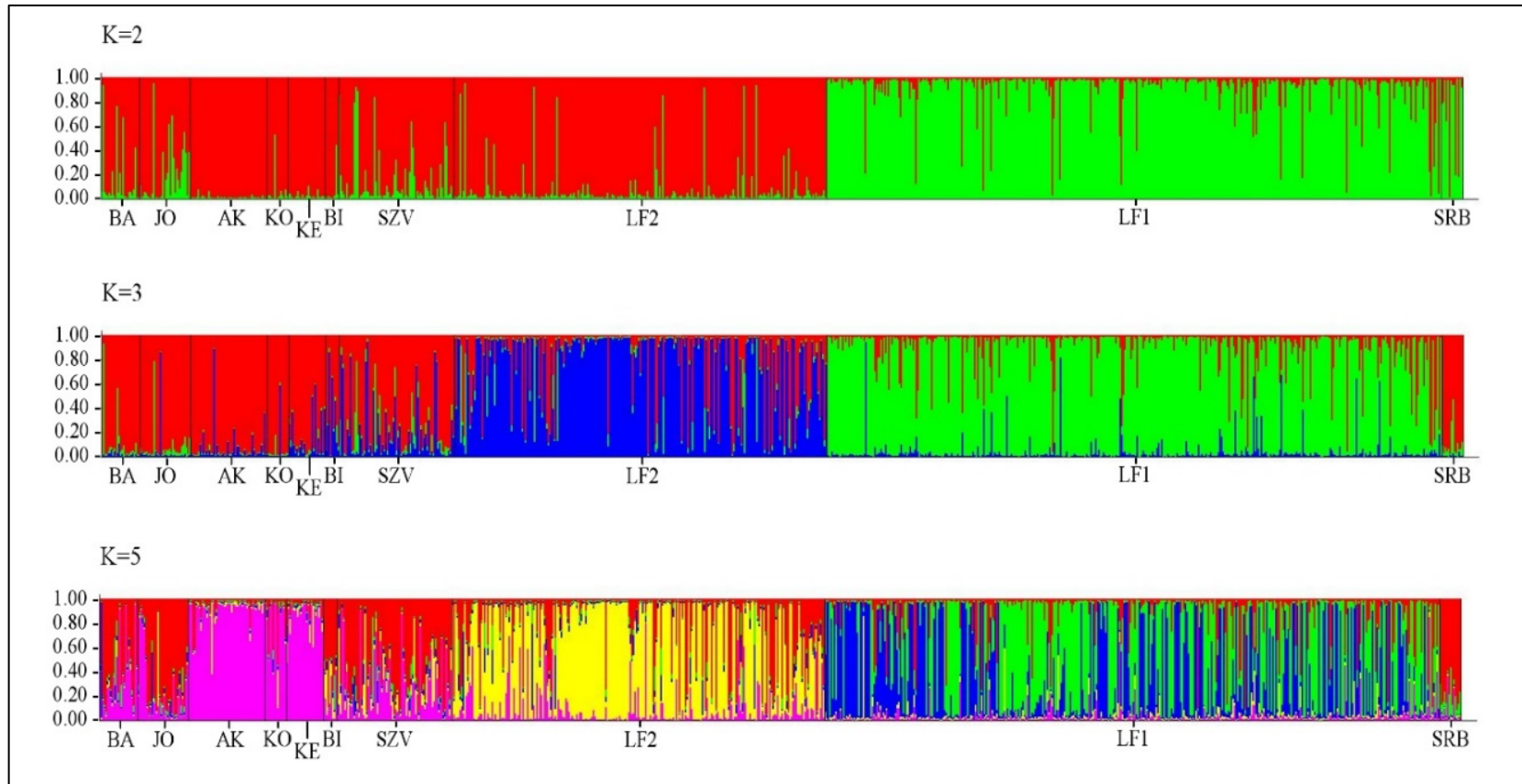
A nukleáris PCR-RFLP markerek esetén a szerb kontroll populáció szignifikánsan eltért a többi populációtól ($F_{ST}=0,558-0,920$, $p<0,001$). A magyar populációk közt közepes és nagymértékű szignifikáns genetikai divergenciát találtam ($F_{ST}=0,027-0,231$, $p<0,05$), és a Bittva-, Kölöntés és Kemence-patakok voltak a leginkább eltérő populációk ($F_{ST}=0,116-0,231$). A mikroszatellit lókuszok elemzése minden populáció közt szignifikáns genetikai eltérést jelzett ($p<0,001$). A párosított F_{ST} -értékek a magyar populációk között közepes genetikai különbségre utaltak ($F_{ST}=0,042-0,217$), és nagymértékű eltérést mutattak a magyar populációk és a szerb kontroll állomány között ($F_{ST}=0,222-0,369$). Az átlagos F_{ST} -érték az összes populáció esetén $0,110 \pm 0,039$ volt. A szerb kontroll mellett a legnagyobb különbségeket szintén a Bittva- és a Kölöntés-patakok esetén mértem.

A mikroszatellit lókuszok allélfrekvenciái alapján meghatároztam a populációk közti Nei-féle (D_a) genetikai távolságokat, és elkészítettem a populációk filogenetikai fáját (Neighbor-joining, NJ) (4. ábra). Az eredmények alapján szintén a szerb kontroll állomány tért el a legjobban a többi populációtól ($D_a=0,537-0,682$), és a hazai populációk közt a legnagyobb genetikai távolságot is ugyanott mértem ($D_a=0,582$), ahol a legnagyobb genetikai differenciáltságot is tapasztaltam ($F_{ST}=0,217$): a Bittva- és a Kölöntés-patak populációi közt, és szintén ez a két populáció mutatta a legnagyobb genetikai távolságot a többi populációtól. Ezen kívül a dendrogram megmutatta a hazai természetes vízfolyások és a tenyészállományok közti genetikai különbséget, azonban a populációk közti genetikai távolság, az F_{ST} -hez hasonlóan mérsékelt ($D_a=0,165-0,582$) volt.



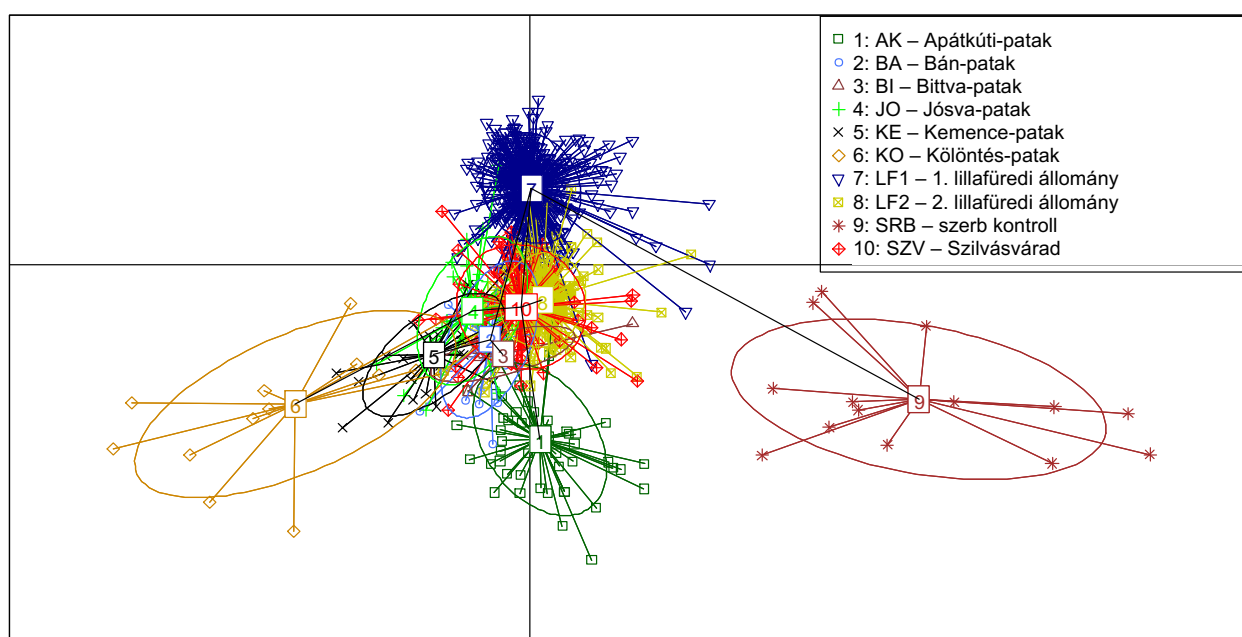
4. ábra: Neighbor-joining filogenetikai fa a mikroszatellit lókuszok allélfrekvenciáiból számolt Da-távolságok alapján (Nei et al., 1983). A számok a csomóponttól mért távolságot mutatják.

A teljes mintahalmaz genetikai összetételének vizsgálatához az egyedek mikroszatellit analízise alapján STRUCTURE szoftver segítségével meghatároztam az állományok genetikai szerkezetét földrajzi hozzárendelés nélkül, különböző klaszterek jelenlétét feltételezve. A STRUCTURE Harvester programcsomaggal végzett elemzés nem adott egyértelmű ΔK eredményt, feltárva a mintahalmaz 2, 3 és 5 lehetséges klaszterét, azaz a 10 mintavételi helyről származó minták genetikailag 2, 3, vagy 5 külön csoportba sorolhatóak be (**5. ábra**). A klaszterszámok legnagyobb valószínűsége 2-nél volt, míg a legkisebb az 5-ös értéknél. Az eredmények tükrözik a Nei-féle genetikai távolságok alapján készített dendrogram elrendezését (**4. ábra**), azonban egyetlen klaszter sem korlátozódott egy populációra. Minden esetben a két lillafüredi (LF1 és LF2) tenyészállomány egyedei különböző klaszterekbe estek, illetve 3 és 5 klaszter esetén a többi populációtól is elkülönültek. A szilvásváradai tenyészállományban (SZV) lévő egyedek klaszterekhez való hozzárendelési valószínűsége átmeneti csoportot mutat a másik két tenyészállomány és a vad populációk között. A szerb kontroll csoport 5 klaszterhez rendelés esetén válik el a legjobban a többi populációtól, azonban nem alkot külön klasztert. A populációkat egyben vizsgálva az Apátkúti-patak egyedei közt figyelhető meg a legkisebb variancia.



5. ábra: A teljes mintahalmaz lehetséges genetikai szerkezete $K = 2, 3$ és 5 klaszterekre bontva. Az egyedek klaszterekhez való hozzárendelését STRUCTURE szoftverrel készítettem el a mikroszatellit lókuszok eredményeit felhasználva, előzetes földrajzi csoportosítás nélkül. Az y tengelyen az adott egyed klaszterekhez való hozzárendelésének valószínűsége látható.

A genetikai távolságok alapján PCA elemzést (Principal Component Analysis vagy főkomponens analízis) is végeztem, melynek eredménye a STRUCTURE analízishez hasonló összetételű, de strukturáltabb klaszterezést mutatott (**6. ábra**). Az egyedeket a tengelyek három fő csoportra osztják, amiből egyet főként az LF1 tenyészállomány alkot, egy pedig legfőképp a szerb populáció egyedeiből áll. A harmadik nagyobb csoport főként a függőleges tengely mentén helyezkedik el és a többi állomány átfedő egyedei alkotják, melyekből a STRUCTURE elemzéshez hasonlóan kiválnak az Apátkúti- és a Kölöntés-patak egyedei.



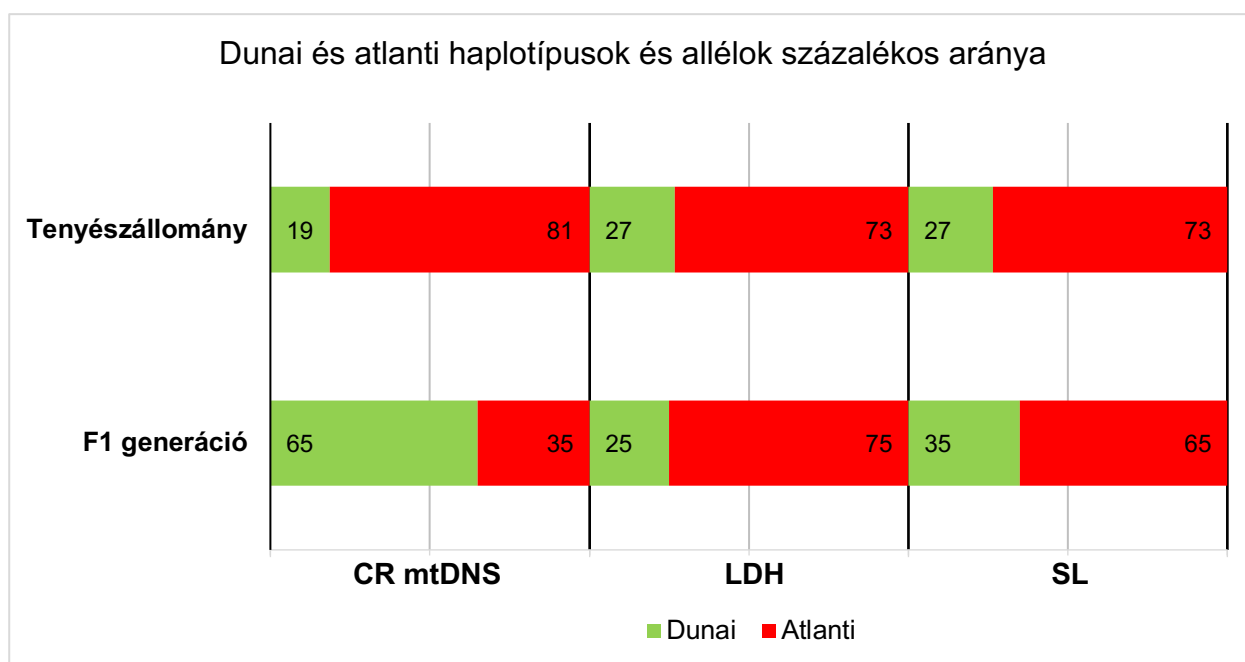
6. ábra: A vizsgált állományok főkomponens analízise (PCA) a mikroszatellit lókuszok eredményei alapján

Mindkét szerkezeti elemzés a populációk közötti mérsékelt szétválásra utalt, amit az AMOVA elemzés eredményei is alátámasztottak. Az AMOVA vizsgálat a populációk közti alacsony varianciára utalt (a teljes variancia 10%-a, szabadsági fok=9), míg a teljes variancia 90%-a a populációkon belül található (szabadsági fok=1775), ami főként az egyedeken belüli varianciához kapcsolódik (a teljes variancia 81% -a, szabadsági fok=888), és csak alacsony variancia figyelhető meg az egyedek között (9%, szabadsági fok= 878).

3.4. Genetikai markerekre alapozott tenyésztési rendszer kialakítása

A markerekre alapozott szaporítás során a két lillafüredi állományt egyben kezeltem (644 egyed). A sejtmagi allélok alapján létrehozott pontozási rendszerben az egyedek átlagos pontszáma 3 volt, a minimum érték 0 és a maximum érték 9 volt. Összesen 93 db dunai

mitokondriális haplotípussal rendelkező ikrás egyedeket találtam. A 2014. novemberében szaporított F1 generáció, 31 egyedének analízise során a három PCR-RFLP lókusznál a CR mtDNS-en a dunai haplotípus aránya nagymértékben (19-ről 65%-ra) növekedett, az SL lókuszon szintén megfigyelhető egy kissé kisebb (27-ről 35%-ra) dunai allél növekedés, azonban az LDH lókuszon nem tapasztaltam a dunai allélok feldúsulását (7. ábra). A mikroszatellit lókusznál az allélok vonal szerinti besorolása nem egyértelmű a sok új allél miatt, azonban összességében elmondható, hogy az F1 generációban minden lókusznál az irodalomban fellelhető dunai allélok magas aránya figyelhető meg (pl. SsoSL438 lókusznál).



7. ábra: Dunai és atlanti alléllal/haplotípussal rendelkező sebes pisztrángok aránya a lillafüredi tenyészállományban (n=644) és az genetikai markerek alapján szaporított F1 generációban (n=31), a három PCR-RFLP lókusznál vizsgálata alapján

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1. A hazai sebes pisztráng állományok evolúciós vonal szerinti csoportosítása

Munkám során felmértem hat hazai és egy külföldi természetes vízfolyás és három sebes pisztráng tenyészállomány genetikai összetételét, nyolc DNS marker alkalmazásával. A vizsgált markerek alkalmazhatóságát számos korábbi vizsgálat bizonyította a genetikai összetétel hatékony elemzése szempontjából, azonban figyelembe kell venni a génsodródás eltérő hatását az egyes markerek esetén, amit az alacsony mintaszámok is befolyásolhatnak (Hansen et al., 2000; Henry & Ferguson, 1985; Horreo et al., 2015; Marić et al., 2006). A minták elemszámai nagyban függtek a mintavétel körülményeitől, a hidrogeográfiai jellemzőktől vagy a halak mennyiségétől az adott vízfolyásban. Például a Bittva-patakot csak három ponton tudtuk mintázni (mindegyiket 100 méteres szakaszon), egymástól néhány km-re, illetve további populációk esetén is a minták mennyisége viszonylag alacsony volt, különösképp a Kőöntés-patakban és a szerb kontrollcsoportban.

A hazai pisztráng állományok eredetéről nagyon kevés információ áll rendelkezésre, és az ismeretek többsége anekdotikus információkból származik. Ennek oka, hogy az I. világháború előtt főként a mai Szlovákiában, Ukrajnában és Romániában található magasabb hegyvidéki pisztrángos vizeket részesítették előnyben, és csak az 1920-as évek után nőtt meg az érdeklődés a mai Magyarország alacsony hegyláncainak pisztrángos vizei iránt. A lillafüredi pisztrángtelepet 1932-ben alapították, és az első ikrák az osztrák Traismauerből és szlovákiai Znióvárjáról (Kláštor pod Znievom) érkeztek 1933-ban. Ebből és a környező patakokból származó egyedek szaporításából származik a hazai patakokba telepített halak többsége, többek közt a Bán- és Jósva-patakokban is dokumentálták ezen halak leszármazottjait (Hoitsy, 2002). A szilvásvárad sebes pisztráng tenyészállomány eredetileg a Szalajka-patakban természetesen is előforduló egyedekből származott, azonban további alakulásáról hivatalos adatokkal nem rendelkezünk.

A vizsgálataim feltárták a tenyészállományok kevert eredetét, valamint a természetes állományokon belül az atlanti és dunai vonal genetikai keveredését. A mintavételi helyszínek a Duna vízgyűjtőjébe esnek, így főként a dunai vonalra jellemző allélok megjelenését vártam, azonban minden hazai helyszínen nagy arányban találtam atlanti haplotípusokat és allélokat. Az általam megfigyelt atlanti haplotípusokat már több európai populációban is kimutatták (pl. At1 és At2: Cortey et al., 2009; At3: Duftner et al., 2003). Főként az Atlanti-medencére jellemzőek (pl. Spanyolországban, Norvégiában és Izlandon is megtalálhatóak), azonban a Duna vízgyűjtőjének nyugati részén, és kevert természetes állományokban is megjelentek, többek közt például Ausztriában, Csehországban, Szlovákiában és Olaszországban (Cortey et al., 2009; Duftner et al., 2003; Fruciano et al., 2014; Gratton et al., 2014; Kohout et al., 2012; Meraner et al., 2007). A

vizsgált mintahalmazban megfigyelhető dunai haplotípusok egy részét korábban csak Ausztria és Szlovákia természetes populációiban írták le (Da1, Da2, Da3: Duftner et al., 2003; Kohout et al., 2012), illetve két haplotípust (Da4 és Da5), melyek a magyar állományokon belül csak a tenyészetekben jelentek meg, e vizsgálat előtt szintén csak szlovák patakokban mutattak ki (Kohout et al., 2012). A Da6 haplotípust ezidáig nem írták le, azonban a network analízis alapján a dunai vonalhoz tartozik. Ezen haplotípus előfordulása a Kemence-patak egyetlen egyedére korlátozódott, azonban a privát haplotípus tisztázásához a populáció további egyedeinek vizsgálata szükséges.

Eredményeimhez hasonlóan, a sebes pisztráng különböző mitokondriális vonalainak introgresszív hibridizációját a Duna vízgyűjtőjében több helyen is kimutatták. Csehország és Szlovákia területén, 25 természetes és öt tenyészállomány, 638 egyedének vizsgálata során megállapították, az atlanti vonal túlsúlyát (66-95%) a Duna vízgyűjtőjében, ami egyértelműen az atlanti forrásból származó telepítések következtében alakult ki (Kohout et al., 2012). Ausztriában 117 helyszínen 2568 egyed vizsgálta során feltárták a különböző sebes pisztráng populációk genetikai összetételét: a Duna bajorországi szakaszán az atlanti mitokondriális vonal dominál (74-100%), majd a folyásirány szerint lefelé haladva a dunai haplotípus növekvő százalékát tapasztalták (24-70%). A tiszta dunai állományok az Alpokban található, izolált vízfolyásokra korlátozódtak, míg a Duna felső szakaszán, az Alpoktól észak-északkeletre, a két vízgyűjtő határán, az atlanti vonal utolsó jégkorszak alatti, természetes megjelenését is dokumentálták. Ezzel szemben az Alpoktól dél-délkeletre az atlanti vonal megjelenése egyértelműen a telepítésekből és az azt követő introgresszióból ered (Lerceteau-Köhler et al., 2013; Schenekar et al., 2014). Az atlanti vonal dunai vízgyűjtőben való természetes előfordulásáról korlátozott információk állnak rendelkezésre, illetve ezidáig csak a vízgyűjtők határán írták le ezt a jelenséget, ezen felül a Duna osztrák és szlovák területén leírt atlanti haplotípusok és allélok aránya a hazai populációkban mérthez hasonlóan alakultak, így magyarországi megjelenésük is a telepítésekhez kapcsolható. Feljegyzések alapján a hazai tenyészállományok részben kevert eredetűek, a hazai vizekből befogott, őshonos sebes pisztráng egyedek és az atlanti eredetű, osztrák, német vagy dán állományokból származó egyedek párosításából erednek. Ezt a tenyésztési stratégiát az utóbbi egyedek jobb gazdasági teljesítményével magyarították (Horreo et al., 2015). Ezen állományokból származó utódokkal 1933 és 2004 között rendszeresen telepítették a hazai természetes vízfolyásokat, ezen felül pedig a magyarországi horgászegyesületek saját területeiket különböző forrásokból származó sebes pisztráng egyedekkel telepítették, melyek együttesen járultak hozzá a vonalak további hibridizációjához.

Magyarországon jelenleg nem létezik olyan szabályozás, amely a fajok szintjét meghaladó, nem őshonos populációkkal rendelkező természetes vízfolyások telepítésére vonatkozna. Habár a

telepítés az autochton (őshonos) populációk fontos természetvédelmi tevékenysége lehet (Taylor, 1991), a hibridizáció rosszabb fitnesszt és az őshonos fajok genetikai keveredését okozhatja (Allendorf et al., 2001). Ideális esetben a telepítést csak a helyi állományból származó egyedek felhasználásával, illetve az egyedek támogató tenyésztésével kellene végezni. Ez a stratégia széles körben elterjedt a lazacfélék megőrzésében (Berrebi et al., 2000; Verspoor et al., 2007; Horreo et al., 2008; Gil et al., 2016). A vonalak keveredése, a kis populációméret és a kevés ivarérett egyed miatt a vizsgált állományok esetén ez nem lehetséges megoldás. Elméletileg, ha Magyarországon találnánk egy olyan populációt, amiben nem tapasztalható a vonalak keveredése, akkor javasoljuk az adott populáció védelmét, és a telepítések elvégzését ebből a populációból származó egyedekkel. Azonban a jelenlegi természetes populációk esetén ez a módszer nem javasolt, mivel egyik állomány sem képvisel egyedi értéket, de populációgenetikailag egészségesek.

Másik megoldás lehet, a dunai génhanyag feldúsítása marker asszociált szelekció révén, majd ezen egyedekkel végzett telepítés annak érdekében, hogy minél többet meg tudjunk őrizni a hazánkban kialakult sebes pisztráng genetikai hátteréből, jóllehet ez a módszer tisztán dunai állomány visszaállítására nem ad lehetőséget (Baric et al., 2010; Weiss, 2005). Az általunk kialakított tenyésztési rendszerrel az F1 generációban sikeresen növeltük a dunai haplotípus és allélok arányát a vizsgált lókuszon a lillafüredi tenyészállomány anyaállományát felhasználva, azonban ügyelni kell az állomány megfelelő fitnesszére, a teljesítmény leromlásának és a beltenyészetttség kialakulásának elkerülésére (Guimaraes et al., 2007).

4.2. A hazai sebes pisztráng állományok populációgenetikai állapota

A sejtmagi markerek populációgenetikai analízise kimutatta, hogy az vizsgált állományok Hardy-Weinberg egyensúlyban vannak. Csak a lillafüredi tenyészetek és Jósva- és Kemence-patak esetén tapasztaltam a megfigyelt heterozigóták számának szignifikáns eltérését az SL és néhány mikorszatellit lókuszon. A csökkent genetikai variancia egyes populációkban a beltenyészetttségre, múltbéli palacknyak-hatásra utalhat, illetve a szerb állomány esetén az izoláció következménye, míg a magas genetikai sokféleség génáramlás hatására alakulhat ki. A tényleges populációméret is befolyásolja a genetikai sokféleség mintázatát. Az alacsony tényleges populáció nagyságú állományok várhatóan alacsonyabb genetikai sokféleséggel rendelkeznek az erősebb genetikai sodródás miatt. Ezenkívül az alacsonyabb diverzitás azt sugallhatja, hogy a közelmúltban kevés egyed alkotta a populációt (Pecsenye, 2006; Freeland et al., 2012). Az említett folyamatok összefügghetnek különböző antropogén hatásokkal is (pl. populációk mesterséges keveredésével), illetve az eredmények utalhatnak a természetes populációk telepítése után maradt, de rosszabb teljesítményű, beltenyészett egyedek jelenlétére is (Ferguson, 2007; Weiss &

Schmutz, 1999). Az *sdY* ivari marker eredményei alapján az ivarok aránya a tenyészállományokban és a Kemence-patakban egyforma, míg a többi vízfolyásban az ikrás egyedek kevesebb, mint 50%-ban fordultak elő. Fontos megjegyezni, hogy ezeket az eredményeket befolyásolhatja a kis populációméret és az abból fakadó alacsonyabb mintaszám is.

A vizsgált állományok közti genetikai keveredést az evolúciós vonalakon túl, a populációgenetikai mutatókkal is igazoltam. Az F_{ST} értékek alapján a magyarországi állományok többsége közt mérsékelt vagy közepes különbséget tapasztaltam, ami a területi elszigeteltség miatt a mesterséges telepítések hatására bekövetkező hibridizációra utalhat (Vähä & Primmer, 2006). Ezt az elméletet a mikroszatellit lokuszok AMOVA elemzése is megerősítette, ami a populációk között alacsony, míg a populációkon belüli magas fokú diverzitásra utalt. A genetikai keveredés részleteit tárták fel a network, klaszter- és főkomponens-analízis eredményei, melyek szintén antropogén eredetű hibridizációra utalhatnak. A STRUCTURE Harvester program nem tudta egyértelműen meghatározni a genetikai klaszterek számát, azonban a különböző analízisek eredményei öt klaszter jelenlétét valószínűsítik. A STRUCTURE analízisben létrejött genetikai csoportok hasonlóan helyezkednek el a populációkon belül, mint a mitokondriális haplotípusok a network analízis során. Ezt az összetételt a PCA elemzés is megerősítette, ami szintén öt genetikai csoportot különített el, miközben az egyének besorolása egyértelműbb volt, mint a STRUCTURE analízisben, ezért javaslom a két elemzés együttes használatát. A természetes vízfolyások és a szilvásváradai tenyészállomány közti átfedés egyértelmű volt, csak a földrajzilag elkülönülő és tisztán dunai, szerb kontroll csoport mutatott nagymértékű eltérést az elemzések során. A hazai állományok vizsgálata során jól látható, hogy a genetikai klaszterek nem kapcsolódnak a földrajzi elhelyezkedésükhöz. Kizárólag a Jósva- és Bán-patakok populáció esetén figyelhető meg enyhe földrajzi és genetikai kapcsolat, azonban ezen populációk is egy klaszterbe kerültek a többi vad állománnyal, amelyek közt viszont genetikai különbségek is megfigyelhetők. A vad állományokra jellemző klaszterek összetett genetikai felépítése az antropogén hatásokon túl, annak az eredménye lehet, hogy az idegen egyedek a telepítések, esetleg természetes vándorlások során szaporodtak az adott vízfolyásban eredetileg élő egyedekkel, amelyek genetikai összetétele a sajátos környezeti feltételekhez már igazodott (Keller et al., 2011).

A keveredések ellenére minden hazai populációban megtalálhatók az ősi genetikai háttér elemei, amelyekre a viszonylag nagyszámú privát allél mennyisége utal. Privát allélok minden populációban találtam, de a frekvenciák alacsonyak voltak, legnagyobb arányban a Bittva- és Kölöntés-patakokban sikerült kimutatni egyedi allélokot, ami arra utal, hogy az izolált, kis populációk fontosak lehetnek a genetikai sokféleség megőrzésében, ahogy azt Norvégiában és Romániában kimutatták (Linløkken et al., 2014; Popa et al., 2019). Azonban nem találtam olyan egyedet melyben nem tapasztalható a vonalak keveredése. A „tisztá” egyedek azonosítására az

elemzett egyedek és populációk számának növelésével lenne lehetőség (Hansen & Mensberg, 2009).

Eredményeim alapján az európai állományokhoz hasonlóan a telepítések hatására kialakuló genetikai keveredések figyelhetőek meg a hazai sebes pisztráng állományok esetén. Az egyedi populációk értékének elvesztése mellett a nem őshonos halakkal történő hibridizáció hatására, a vadon élő egyedek csökkent fitnessét figyelhető meg (Muhlfeld et al., 2009; Pinter et al., 2019). A fenntartható halgazdálkodás szempontjából a sebes pisztráng tenyésztése és telepítése során az alábbi szempontokat javaslom figyelembe venni:

- Meg kell határozni, hogy szükséges-e a telepítés a meglévő vadállomány mellett. Ha lehetséges, kiegészítő állomány helyett támogató tenyésztést kell előnyben részesíteni.
- Kerülni kell a különböző vízgyűjtők közötti átvezetéseket és a különböző eredetű pisztrángok keverését.
- A halaknak olyan vízgyűjtőből vagy régióból kell származniuk, ahová kihelyezik őket. Figyelembe kell venni a hidrogeográfiai, a helyi környezeti viszonyokat és a genetikai elemzések eredményeit.
- Génmegőrzési célból tartott tenyészállományok egyedeit nem szabad sok generáción keresztül tenyészteni vadon élő, helyi halakkal történő vérfrissítés nélkül a genetikai sodródás és a genetikai variabilitás csökkenésének megakadályozása érdekében.
- A génmegőrzési célból tenyésztett egyedeket a természetes környezethez hasonló körülmények között kell nevelni a háziasítás és a szelekció hatásának csökkentése érdekében.
- El kell kerülni az erősen háziasított és más területekről származó egyedek telepítését.
- A mesterséges szaporítás technikáit optimalizálni kell a populációk genetikai változatosságának megőrzése érdekében.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az elvégzett munkám alapján a következő új tudományos eredményeket értem el:

1. Elvégeztem hat hazai és egy külföldi természetes vízfolyás és három sebes pisztráng tenyészállomány első, átfogó genetikai vizsgálatát és összehasonlítását. Megállapítottam, hogy a hazai állományok genetikai összetétele átfed, csak a szerb populáció különíthető el egyértelműen.

2. Nyolc DNS marker alkalmazásával elvégeztem a sebes pisztráng jellemző evolúciós vonalainak elkülönítését a vizsgált állományokban. A hazai állományok esetén az atlanti és dunai vonal keveredését mutattam ki, míg a szerb populációban csak a dunai vonalra jellemző allélokat találtam.

3. Kimutattam egy új dunai haplotípust a mitokondriális DNS kontroll régiójában a Kemence-patak egyedei közt.

4. Leírtam a vizsgált populációkra jellemző mikroszatellit allélméreteket és privát allélokat.

5. A különböző lazacfélékben leírt, Y kromoszómához kötött, ivari marker alkalmazásával felmértem a vizsgált állományok ivari összetételét. Megállapítottam, hogy a tenyészállományokban a két ivar aránya egyenlő, míg a természetes vízfolyásokban a hím ivar túlsúlyát tapasztaltam.

6. Sikeresen létrehoztam a DNS-markerekre alapozott tenyésztési rendszert a lillafüredi sebes pisztráng állományban.

6. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

6.1. Az értekezés témakörében megjelent tudományos publikációk

1. **Ágnes Ósz**, Ákos Horváth, György Hoitsy, Dóra Kánainé Sipos, Szilvia Keszte, Anna Júlia Sáfrány, Saša Marić, Csaba Palkó, Balázs Tóth, Béla Urbányi, Balázs Kovács (2018): The genetic status of the Hungarian brown trout populations; exploration of a blind spot on the European map of *Salmo trutta* studies. PeerJ 6:e5152 <https://doi.org/10.7717/peerj.5152>
2. **Ágnes Ósz**, Lőrinc Sándor Pongor, Danuta Szirmai, Balázs Györffy (2017): A snapshot of 3649 web-based services published between 1994 and 2017 shows a decrease in availability after 2 years. Briefings in Bioinformatics (2017) bbx159, DOI 10.1093/bib/bbx159
3. Ákos Horváth, György Hoitsy, Balázs Kovács, Dóra Kánainé Sipos, **Ágnes Ósz**, Klavdija Bogataj, and Béla Urbányi (2014): The effect of domestication on a brown trout (*Salmo trutta m fario*) broodstock in Hungary. Aquaculture International (2014) 22:5–11, DOI 10.1007/s10499-013-9665-2
4. **Ósz Ágnes**, Horváth Ákos, Hoitsy György, Keszte Szilvia, Sáfrány Anna Júlia, Balogh Erna, Gutti Csaba, Nagy Bálint, Lefler Kinga Katalin, Urbányi Béla, Kovács Balázs (2016): Az ivararányok fenotípusos és molekuláris genetikai vizsgálata hazai sebespisztráng-állományokban. Halászat-Tudomány, Vol. 2/2. (2016) pp. 13-17

6.2. Az értekezés témájában tartott előadások

1. **Ósz Á**, Kovács B, Kánainé Sipos D, Hoitsy Gy, Snoj A, Keszte Sz, Sáfrány AJ, Herzinyák Z, Kaczkó D, Palkó Cs, Urbányi B, Horváth Á (2015): Genetic background and population genetics of Hungarian brown trout populations using PCR-RFLP and microsatellite markers. 15th European Congress of Ichthyology, Porto, Portugal, 7-11. September 2015, Book of abstracts p. 127-128.
2. **Ágnes Ósz**, Dóra Kánainé Sipos, Balázs Kovács, György Hoitsy, Aleš Snoj, Klavdija Bogataj, Gergely Bernáth, Zita Herzinyák, Dániel Kaczkó, Béla Urbányi, Ákos Horváth (2014): Genetic structure study of the Hungarian brown trout populations using PCR-RFLP and microsatellite markers. Adding Value –Aquaculture Europe 2014, 14th – 17th October 2014, Donostia–San Sebastián, Spain. (Abstract 935-936. p.)
3. **Ágnes Ósz**, Dóra Kánainé Sipos, Balázs Kovács, György Hoitsy, Aleš Snoj, Klavdija Bogataj, Gergely Bernáth, Zita Herzinyák, Dániel Kaczkó, Béla Urbányi, Ákos Horváth (2014): Investigation of Hungarian brown trout populations using PCR-RFLP and microsatellite markers. Integrated Perspectives On Fish Stock Enhancement, 2014 Annual

Symposium of the Fisheries Society of The British Isles, 7th – 11th July 2014, University of Hull, United Kingdom. (Abstract 22. p.)

4. **Ősz Á**, Keszte Sz, Sáfrány A J, Tóth B , Palkó Cs, Horváth J, Balogh E, Uri Cs, Guti Cs F, Lefler K K, Urbányi B, Horváth Á, Kovács B (2016): Hazai természetes vízi sebespisztráng-állományok (*Salmo trutta m. fario*) genetikai vizsgálata. XXII. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely, 2016. május 26.
5. **Ágnes Ősz**, Balázs Kovács, Dóra Kánainé Sipos, György Hoitsy, Aleš Snoj, Klavdija Bogataj, Gergely Bernáth, Zita Herzinyák, Dániel Kaczkó, Béla Urbányi, Ákos Horváth (2014): Genetic investigation of Hungarian wild and domesticated brown trout populations using PCR-RFLP and microsatellite markers. Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája 2014, 2014. március 7. Szeged (Kivonat 33. p.)
6. **Ősz Ágnes**, Horváth Ákos, Kovács Balázs (2013): Hazai vad és tenyésztett sebespisztráng-állományok genetikai hátterének felmérése és egy genetikai markerekre alapozott tenyésztési rendszer kialakítása. SZIE Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola VII. fóruma, Gödöllő, 2013. június 19.

6.3. Az értekezés témájában megjelent poszter, absztrakt

1. **Á. Ősz**, Á. Horváth, Sz. Keszte, D. Kánainé Sipos, A. J. Sáfrány, Z. Herzinyák, D. Kaczkó, Cs. Palkó, B. Urbányi, B. Kovács (2016): The effect of hybridization on wild brown trout (*Salmo trutta m. fario*) populations in Hungary. Aquaculture Europe 2016, 19th – 23th September 2016, Edinburgh, United Kingdom
2. **Ősz Á.**, Kovács B., Kánainé Sipos D., Hoitsy Gy., Snoj A., Urbányi B., Horváth Á. (2015): Improvement of a marker-assisted breeding system to increase the proportion of native alleles in a Hungarian brown trout broodstock. 12th International Symposium on Genetics in Aquaculture, Santiago de Compostela, Spain, 21-27. June 2015, Book of abstracts p. 198.
3. **Ágnes Ősz**, Balázs Kovács, Dóra Kánainé Sipos, Dániel Kaczkó, Zita Herzinyák, Aleš Snoj, Klavdija Bogataj, Béla Urbányi, Ákos Horváth (2013): Origin and genetic structure of several Hungarian wild and domesticated brown trout populations based on PCR-RFLP and microsatellite markers. Water & Fish Conference, 12th-14th June 2013, Belgrade, Serbia. (Abstract 305-309. p.)
4. Ákos Horváth, Balázs Kovács, Dóra Kánainé Sipos, **Ágnes Ősz**, Gergely Bernáth, György Hoitsy (2013): A marker-assisted breeding system for brown trout. Diversification In Inland Finfish Aquaculture II (Difa II), 2013. szeptember 24-26. Vodňany, Csehország.

5. Keszte Sz, **Ősz Á**, Nagy B, Sáfrány A J, Balogh E, Uri Cs, Horváth Á, Lefler K K, Hoitsy Gy, Urbányi B, Kovács B (2016); Ivar-detektálás sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) állományokban molekuláris genetikai markerrel. II. Fialat Biotechnológusok II. Országos Konferenciája, Gödöllő, 2016. március 21-22.
6. Kovács B, **Ősz Á**, Keszte Sz, Nagy B, Sáfrány A J, Balogh E, Uri Cs, Horváth Á, Lefler K K, Hoitsy Gy, Urbányi B (2015): Sebes pisztráng egyedek ivarának vizsgálata molekuláris genetikai markerrel. XXXIX. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2015. május 20-21.
7. **Ősz Ágnes**, Kánainé Sipos Dóra, Horváth Ákos, Kovács Balázs, Hoitsy György, Aleš Snoj, Klavdija Bogataj, Bernáth Gergely, Herzinyák Zita, Kaczkó Dániel, Urbányi Béla (2013): Hazai vad és tenyésztett sebespisztráng-állományok genetikai vizsgálata PCR-RFLP és mikroszatellit markerek analízise alapján. XXXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás Szarvas, 2013. május 22-23. (Kivonat 6. p.)

6.4. Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent tudományos publikációk

1. János Tibor Fekete, **Ágnes Ősz**, Imre Pete, Gyula Richárd Nagy, Ildikó Vereczkey, Balázs Györffy (2020): Predictive biomarkers of platinum and taxane resistance using the transcriptomic data of 1816 ovarian cancer patients. *Gynecologic Oncology* 156 (2020) 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.01.006>
2. Ádám Nagy, **Ágnes Ősz**, Jan Budczies, Szilvia Krizsán, Gergely Szombath, Judit Demeter, Csaba Bödör, Balázs Györffy (2019): Elevated HOX gene expression in acute myeloid leukemia is associated with NPM1 mutations and poor survival. *Journal of Advanced Research* 20 (2019) 105–116, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.05.006>
3. Dóra Kánainé Sipos, Gyula Kovács, Eszter Buza, Katalin Csenki-Bakos, **Ágnes Ősz**, Uroš Ljubobratović, Réka Cservedi-Szücs, Miklós Bercsényi, István Lehoczky, Béla Urbányi, Balázs Kovács (2019): Comparative genetic analysis of natural and farmed populations of pike-perch (*Sander lucioperca*). *Aquaculture International* (2019) 27:991–1007 <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00365-7>
4. Kánainé Sipos Dóra, Bakos Katalin, **Ősz Ágnes**, Hegy, Árpád, Müller Tamás, Urbányi Béla, Kovács Balázs (2019): Development and characterization of 49 novel microsatellite markers in the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Molecular Biology Reports* 46 : 6 pp. 6599-6608. , 10 p. (2019)

5. **Ágnes Ósz**, Lőrinc Sándor Pongor, Danuta Szirmai, Balázs Györffy (2017): A snapshot of 3649 Web-based services published between 1994 and 2017 shows a decrease in availability after 2 years. *Briefings in Bioinformatics* (2017) bbx159, DOI 10.1093/bib/bbx159

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P., & Wenburg, J. K. (2001). The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, *16*(11), 613–622. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02290-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02290-X)
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *16*(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Baric, S., Riedl, A., Meraner, A., Medgyesy, N., Lackner, R., Pelster, B., & Dalla Via, J. (2010). Alpine headwater streams as reservoirs of remnant populations of the Danubian clade of brown trout. *Freshwater Biology*, *55*(4), 866–880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02318.x>
- Bernatchez, L., & Danzmann, R. G. (1993). Congruence in control-region sequence and restriction-site variation in mitochondrial DNA of Brook Charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill)1. *Molecular Biology and Evolution*, *10*(5), 1002–1014. [http://www.bio.ulaval.ca/louisbernatchez/pdf/\(018\)Bernatchez_MBE_93.pdf](http://www.bio.ulaval.ca/louisbernatchez/pdf/(018)Bernatchez_MBE_93.pdf)
- Berrebi, P., Povz, M., Jesensek, D., Cattaneo-Berrebi, G., & Crivelli, A. J. (2000). The genetic diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soca river, Slovenia. *Heredity*, *85*(3), 277–287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.00753.x>
- Bogataj, K. (2010). Genetic analysis of native brown trout (*Salmo trutta*) populations in Slovenia.
- Carney, M., Taggart, J. B., & Høyheim, B. (2000). Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids. *Molecular Ecology*, *9*, 2175–2178.
- Cortey, M., Vera, M., Pla, C., & García-Marín, J. L. (2009). Northern and Southern expansions of Atlantic brown trout (*Salmo trutta*) populations during the Pleistocene. *Biological Journal of the Linnean Society*, *97*(4), 904–917. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01220.x>
- Duftner, N., Weiss, S., Medgyesy, N., & Sturmbauer, C. (2003). Enhanced phylogeographic information about Austrian brown trout populations derived from complete mitochondrial control region sequences. *Journal of Fish Biology*, *62*, 427–435. <https://doi.org/10.1046/j.0022-1112.2003.00038.x>
- 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*(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>

- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, *14*(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Ferguson, A. (2007). Genetic impacts of stocking on indigenous brown trout populations. In *Environment Agency*.
- Ford, M. (1998). Testing Models of Migration and Isolation Among Populations of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Evolution*, *52*(2), 539–557. <https://doi.org/10.2307/2411089>
- Freeland, J. R., Kirk, H., & Petersen, S. (2012). Molecular Ecology: Second Edition. In *Molecular Ecology: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9780470979365>
- Fruciano, C., Pappalardo, A. M., Tigano, C., & Ferrito, V. (2014). Phylogeographical relationships of Sicilian brown trout and the effects of genetic introgression on morphospace occupation. *Biological Journal of the Linnean Society*, *112*(3), 387–398. <https://doi.org/10.1111/bij.12279>
- Gil, J., Labonne, J., & Caudron, A. (2016). Evaluation of strategies to conserve and restore intraspecific biodiversity of brown trout: outcomes from genetic monitoring in the French Alps. In *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. <https://doi.org/10.1007/s11160-015-9405-y>
- Goudet, J. (2001). *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)*. Updated from Goudet (1995) by J. Goudet. (p. Available at <http://www.unil.ch/izea/softwares/fst>).
- Gratton, P., Allegrucci, G., Sbordoni, V., & Gandolfi, A. (2014). The evolutionary jigsaw puzzle of the surviving trout (*salmo trutta* l. complex) diversity in the italian region. a multilocus bayesian approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *79*(1), 292–304. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.06.022>
- Guimaraes, E. P., Ruane, J., Scherf, B. D., Sonnino, A., & Dargie, J. D. (2007). Marker-assisted selection : current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. *Food and Agriculture Organization of the Unites Nations*. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2009.00834.x>
- Hansen, M. M., & Mensberg, K.-L. D. (2009). Admixture analysis of stocked brown trout populations using mapped microsatellite DNA markers: indigenous trout persist in introgressed populations. *Biology Letters*, *5*(June), 656–659. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0214>
- Hansen, M. M., Ruzzante, D. E., Nielsen, E. E., & Mensberg, K. L. D. (2000). Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology*, *9*(5), 583–594.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00898.x>

- Henry, T., & Ferguson, A. (1985). Kinetic studies on the lactate dehydrogenase (LDH-5) isozymes of brown trout, *Salmo trutta* L. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 82(1), 95–98. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(85\)90134-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(85)90134-8)
- Hoitsy, G. (2002). *A pisztráng tenyésztése és horgászata* (K. Pintér (ed.)). '96 Studió Kft.
- Horreo, J. L., Abad, D., Dopico, E., Oberlin, M., & Garcia-Vazquez, E. (2015). Expansion of non-native brown trout in South Europe may be inadvertently driven by stocking: Molecular and social survey in the North Iberian Narcea River. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15546–15559. <https://doi.org/10.3390/ijms160715546>
- Horreo, J. L., Machado-Schiaffino, G., Griffiths, A., Bright, D., Stevens, J., & Garcia-Vazquez, E. (2008). Identification of differential broodstock contribution affecting genetic variability in hatchery stocks of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 280(1–4), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.004>
- Jombart, T., Ahmed, I., Calboli, F., Cori, A., Reiners, T. E., Solymos, P., & Jombart, M. T. (2008). Package ‘adegetnet.’ *Bioinformatics Application Note*, 24(11), 1403–1405. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jug, T., Berrebi, P., & Snoj, A. (2005). Distribution of non-native trout in Slovenia and their introgression with native trout populations as observed through microsatellite DNA analysis. *Biological Conservation*, 123(3), 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.11.022>
- Keller, I., Taverna, A., & Seehausen, O. (2011). Evidence of neutral and adaptive genetic divergence between European trout populations sampled along altitudinal gradients. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05067.x>
- Kohout, J., Jaškova, I., Papoušek, I., Šedivá, A., & Šlechta, V. (2012). Effects of stocking on the genetic structure of brown trout, *Salmo trutta*, in Central Europe inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers. *Fisheries Management and Ecology*, 19, 252–263.
- Langella, O. (2002). *Populations*, 1.2.30. Copyright (C) 1999, Olivier Langella, CNRS UPR9034. (p. Available at <http://bioinformatics.org/tryphon/po>).
- Lerceteau-Köhler, E., & Weiss, S. (2006). Development of a multiplex PCR microsatellite assay in brown trout *Salmo trutta*, and its potential application for the genus. *Aquaculture*, 258(1–4), 641–645. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.028>
- Lerceteau-Köhler, E., Schliewen, U., Kopun, T., & Weiss, S. (2013). Genetic variation in brown trout *Salmo trutta* across the Danube, Rhine, and Elbe headwaters: a failure of the phylogeographic paradigm? *BMC Evolutionary Biology*, 13, 176.

<https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-176>

- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, *25*(11), 1451–1452.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Linløkken, A. N., Johansen, W., & Wilson, R. (2014). Genetic structure of brown trout, *Salmo trutta*, populations from differently sized tributaries of Lake Mjøsa in south-east Norway. *Fisheries Management and Ecology*. <https://doi.org/10.1111/fme.12101>
- Marić, S., Simonović, P., & Razpet, A. (2010). Genetic characterization of broodstock brown trout from Bled fish-farm, Slovenia. *Periodicum Biologorum*, *112*(2), 145–148.
- Marić, S., Snoj, A., Nikolić, V., & Simonović, P. (2006). Genetic differentiation of trout (*Salmo* spp.) populations in Serbia ascertained using RFLP technique on PCR amplified control region of mitochondrial DNA. *Acta Veterinaria*, *56*(5–6), 423–430.
<https://doi.org/10.2298/AVB0606423M>
- McMeel, O. M., Hoey, E. M., & Ferguson, A. (2001). Partial nucleotide sequences, and routine typing by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, of the brown trout (*Salmo trutta*) lactate dehydrogenase, LDH-C1*90 and*100 alleles. *Molecular Ecology*, *10*(1), 29–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01166.x>
- Meraner, A., Baric, S., Pelster, B., & Dalla Via, J. (2007). Trout (*Salmo trutta*) mitochondrial DNA polymorphism in the centre of the marble trout distribution area. *Hydrobiologia*, *579*(1), 337–349. <https://doi.org/10.1007/s10750-006-0479-3>
- Muhlfeld, C. C., Kalinowski, S. T., McMahon, T. E., Taper, M. L., Painter, S., Leary, R. F., & Allendorf, F. W. (2009). Hybridization rapidly reduces fitness of a native trout in the wild. *Biology Letters*, *5*(3), 328–331. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0033>
- Nei, M., Tajima, F., & Tateno, Y. (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, *19*(2), 153–170.
<https://doi.org/10.1007/BF02300753>
- Park, S. D. E. (2001). Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetics Effects of Selection. In *Trinity College*.
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, *28*(19), 2537–2539.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pecsénye, K. (2006). *Populációgenetika*. Pars Kft.
- Pinter, K., Epifanio, J., & Unfer, G. (2019). Release of hatchery-reared brown trout (*Salmo trutta*) as a threat to wild populations? A case study from Austria. *Fisheries Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2019.05.013>

- Popa, G. O., Dudu, A., Bănăduc, D., Curtean-Bănăduc, A., Burcea, A., Ureche, D., Nechifor, R., Georgescu, S. E., & Costache, M. (2019). Genetic analysis of populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Romanian Carpathians. *Aquatic Living Resources*.
<https://doi.org/10.1051/alr/2019021>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, *155*(2), 945–959. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Rambaut, A. (2009). *FigTree, version 1.3.1*. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rexroad, C. E., Coleman, R. L., Hershberger, W. K., Killefer, J., & Iii, C. E. R. (2002). Rapid communication : Thirty-eight polymorphic microsatellite markers for mapping in rainbow trout The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Rapid communication : Thirty-eight. *Journal of Animal Science*, *80*, 541–542.
- Rice, W. E. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, *43*, 223–225.
<https://doi.org/10.2307/2409177>
- Schenekar, T., Lerceteau-Köhler, E., & Weiss, S. (2014). Fine-scale phylogeographic contact zone in Austrian brown trout *Salmo trutta* reveals multiple waves of post-glacial colonization and a pre-dominance of natural versus anthropogenic admixture. *Conservation Genetics*, *15*(3), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0561-0>
- Shimizu, M., Kosaka, N., Shimada, T., Nagahata, T., Iwasaki, H., Nagai, H., Shiba, T., & Emi, M. (2002). Universal fluorescent labeling (UFL) method for automated microsatellite analysis. *DNA Research*, *9*(5), 173–178. <https://doi.org/10.1093/dnares/9.5.173>
- Slettan, A., Olsaker, I., & Lie, Ø. (1995). Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Animal Genetics*, *26*, 281–282.
- Slettan, A., Olsaker, I., & Lie, Ø. (1996). Polymorphic Atlantic salmon, *Salmo salar* L., microsatellites at the SSOSL438, SSOSL439 and SSOSL444 loci. In *Animal genetics* (Vol. 27, pp. 57–58).
- Snoj, A., Glamuzina, B., Razpet, A., Zablocki, J., Bogut, I., Lerceteau-Köhler, E., Pojskić, N., & Sušnik, S. (2010). Resolving taxonomic uncertainties using molecular systematics: *Salmo dentex* and the Balkan trout community. *Hydrobiologia*, *651*(1), 199–212.
<https://doi.org/10.1007/s10750-010-0297-5>
- Sušnik, S., Snoj, A., Pohar, J., & Dovč, P. (1997). The microsatellite marker (BFRO 002) characteristic for Merent geographically remote brown trout, *Salmo trutta* L., populations. *Anima*, *28*, 372.
- Sušnik, S., Snoj, A., & Dovč, P. (2001). Evolutionary distinctness of grayling (*Thymallus*

- thymallus) inhabiting the Adriatic river system, as based on mtDNA variation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 74, 375–385. <https://doi.org/10.1006/bijl.2001.0583>
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 678–687. http://apps.webofknowledge.com.gaelnomade.ujf-grenoble.fr/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=Z2FH8XwWx3KrR9fuTNv&page=1&doc=5
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA 5. *Molecular Biology and Evolution*.
- Taylor, E. B. (1991). A review of local adaptation in Salmonidae, with particular reference to Pacific and Atlantic salmon. In *Aquaculture* (Vol. 98, Issues 1–3, pp. 185–207). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90383-i](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90383-i)
- Vähä, J. P., & Primmer, C. R. (2006). Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*, 15(1), 63–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02773.x>
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Verspoor, E., Stradmeyer, L., & Nielsen, J. (2007). The Atlantic Salmon: Genetics, Conservation and Management. In *The Atlantic Salmon: Genetics, Conservation and Management*. <https://doi.org/10.1002/9780470995846>
- Weiss, S. (2005). Keynote address: Conservation genetics of freshwater organisms. *Bulletin Francais De La Peche Et De La Pisciculture*, 376–377, 571–583. <https://doi.org/10.1051/kmae:2005016>
- Weiss, S., & Schmutz, S. (1999). Response of resident brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to the stocking of hatchery-reared brown trout. *Fisheries Management and Ecology*, 6, 365–375. http://www.uni-graz.at/steven.weiss/docs/5_1999.pdf
- Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., & Guiguen, Y. (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*, 6(3), 486–496. <https://doi.org/10.1111/eva.12032>