

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

**A SZILVÁSVÁRADI PISZTRÁNGTELEP SEBESPISZTRÁNG-
TENYÉSZÁLLOMÁNYÁNAK GENETIKAI VIZSGÁLATA**

Készítette:

Sáfrány Anna Júlia
Állattenyésztő mérnök BSc szak, II. évfolyam

Belső konzulens:

Dr. Horváth Ákos
tudományos főmunkatárs

Dr. Kovács Balázs
tudományos főmunkatárs

Ősz Ágnes
PhD hallgató

Tanszékvezető:

Dr. Urbányi Béla
egyetemi tanár

Gödöllő
2014

Tartalomjegyzék

1 Bevezetés és célkitűzések.....	4
2 Irodalmi áttekintés	5
2.1 Rövidítések, fogalommagyarázat	5
2.2 A sebes pisztráng bemutatása.....	6
2.2.1 A sebes pisztráng morfológiája.....	6
2.2.2 A sebes pisztráng biológiája	8
2.2.3 A pisztráng gazdasági jelentősége	8
2.2.4 A sebes pisztráng vérvonalainak irodalmi háttere	9
2.2.5 Populációk elemzése genetikai markerek segítségével	11
2.3 A felhasznált molekuláris biológiai eljárások irodalmi áttekintése.....	12
2.3.1 Polimeráz-láncreakció (PCR – Polimerase Chain Reaction).....	12
2.3.2 Gélelektroforézis.....	13
2.3.2.1 Agaróz gélelektroforézis	13
2.3.2.2 Kapilláris elektroforézis	14
2.4 Használt genetikai markerek bemutatása	14
2.4.1 Molekuláris genetikai DNS markerek	15
2.4.1.1 A PCR-RFLP markerek.....	15
2.4.1.2 A mikroszatellit-markerek.....	15
3 Módszerek	17
3.1 A mintavétel helyszíne és a mintázás folyamata.....	17
3.2 Alkalmazott molekuláris genetikai módszerek	19
3.2.1 A DNS izolálása szövetből	19
3.2.2 Polimeráz-láncreakció és az alkalmazott markerek	20
3.2.3 A PCR és PCR-RFLP módszerek eredményeinek kimutatása	22
3.2.3.1 Agaróz gélelektroforézis	22
3.2.3.2 Kapilláris gélelektroforézis	23
3.3 Populációgenetikai számítások.....	24
4 Eredmények	26
4.1 A DNS izolálás eredménye	26
4.2 A PCR-RFLP marker-vizsgálatok eredményei	27
4.3 A mikroszatellit marker vizsgálatok eredményei	28

4.3.1 A vérvonalak aránya	28
4.3.2 A mikroszatellit allélok megoszlása	29
4.3.3 A populációgenetikai számítások eredménye	31
5 Értékelés és következtetések.....	33
6 Összefoglalás	34
7 Köszönetnyilvánítás.....	35
8 Irodalomjegyzék	36
8.1 Internetes hivatkozások	38
9 Melléklet.....	39
9.1 Az alkalmazott markerek reakcióelegy összetétele és hőprofilja.....	39
9.2 Az alkalmazott markerek gélképei	43
10 Nyilatkozat	47

1 Bevezetés és célkitűzések

A sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*, Linné, 1758) Európa őshonos, széles elterjedési területtel rendelkező halfaja. Az eltérő földrajzi környezet és a földtörténeti események hatására több „változata” alakult ki, amelyek egy-egy környezethez a legjobban alkalmazkodtak. Ezeknek genetikai vizsgálatok alapján öt különböző vérvonalát különítették el: atlanti, dunai, mediterrán, adriai és márvány. Eredendően mindegyik a nevének megfelelő vízgyűjtő területen alakult ki (a márvány változat az adriai tenger északi részét körülölelő területekről), azonban az atlanti vérvonal génállományát a többi vérvonalhoz tartozó területek populációiban is megtalálták. Az „őshonos” populációk különböző mértékben keveredtek „idegen” változattal, amire problémaként tekintenek a szakemberek. Számos kutatás alapján, a keveredés valószínűsíthetően a betelepítések hatására alakult ki, ugyanis a tenyésztett állományok nagy része az atlanti gyűjtő területéről származtatható. A genetikai keveredés mértékének feltérképezésével több kutatás is foglalkozott Európa-szerte. Magyarországon jelenleg is folynak ilyen irányú vizsgálatok a Halgazdálkodási Tanszék irányítása alatt. Ezen kutatás keretein belül a szilvásváradi pisztrángtelep tenyészállat-állományának genetikai feltérképezését tűztük ki célul, mely magába foglalja az állomány populációgenetikai felmérését, illetve az állományban az őshonos dunai, illetve a behurcolt atlanti génhanyag előfordulásának és arányainak vizsgálatát.

Vizsgálataink során az farok alatti úszóból izolált örökítőanyaggal dolgoztunk. A genetikai felmérésre és a vérvonalak elkülönítésére hét különböző, korábbi kutatásokban már sikeresen alkalmazott genetikai markert választottunk, így a mitokondriális DNS kontroll régiójának egy szakaszát, a genomi DNS-ben kódolt tejsav dehidrogenáz (LDH) és szomatolaktin (SL) enzimek génjeinek egy-egy részét, valamint négy mikroszatellit lókuszt (BFRO 002 (10/2), OMM 1064, Ssa 408 uos, Sso SL 417) vizsgáltuk.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Rövidítések, fogalommagyarázat

Dolgozatom elején szeretnék néhány, a későbbiekben előforduló rövidítést, fogalmat összegyűjteni, megmagyarázni.

- **Allél:** egy adott gén, vagy lokusz eltérő változatai (egy diploid egyedben maximum két változat fordulhat elő).
- **CR mtDNS:** mitokondriális DNS kontroll régiója, más néven D-loop régió. A mitokondriális DNS egy szakasza, amely nem kódol géneket, de lényeges szerepe van a transzkripció és a replikáció során. A D-loop elnevezése DNS replikáció során elektronmikroszkóp alatt látható képére utal.
- **DNS:** dezoxiribonukleinsav, az örökítőanyagot felépítő makromolekula.
- **dNTP:** dezoxiribonukleotid trifoszfát, a DNS láncot felépítő nukleotidok elegye.
- **Gén:** A DNS fehérjéket – és ezen keresztül tulajdonságokat – meghatározó régiója.
- **Genetikai markerek:** bármilyen, az egyes egyedekre jellemző tulajdonság, ami felhasználható egy egyed, a tőle származó utódok vagy a belőle származó termékek azonosítására, nyomonkövetésére. Lehet fenotípus, biokémiai paraméter, enzim- vagy DNS polimorfizmus.
- **Genom:** az egyed teljes génkészlete. Organellum és sejtmagi genomot tudunk megkülönböztetni (Mátyás, 2002).
- **Hibridizáció:** különböző taxonómiai vagy állattenyésztési kategóriába/csoportba tartozó élőlények ivaros kereszteződése. Említést kell tenni a hibridizáció molekuláris genetikai eljárások kapcsán használt eltérő jelentéséről: a PCR reakciók során a különböző DNS-szálak egymással való részbeni kapcsolódása komplementer szakaszaikon keresztül.
- **Introgresszió:** egy hosszabb folyamat, amely különböző taxonómiai csoportok (általában fajok, esetünkben vérvonalak) között jön létre a reprodukciós izoláltság hiányában, ami azzal jár, hogy az egyik csoport génkészletének egy része hibridizálás révén természetes körülmények között is átkerül, beleolvad a másik csoport génkészletébe.

- **LDH:** tejsav dehidrogenáz. Egy, a genomi DNS-ben kódolt enzim, ami a piroszölősvavat alakítja L-tejsavvá.
- **Lókus:** egy génnek, illetve alléljainak fizikai helye a kromoszómán.
- **PCR:** Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció
- **SL:** szomatolaktin. A halak neuroendokrin szabályozásában van szerepe, az ioneqyensúly fenntartásában és az ivaréresi folyamatokban (Horváth, 2000). Szintén a genomi DNS-ben kódolt.

2.2 A sebes pisztráng bemutatása

A sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*, Linné, 1758) a *Salmo trutta* faj édesvízi életmódra áttért formája. Európában őshonos pisztrángfaj, elterjedési területének méretét kitűnő adaptációs készségére lehet visszavezetni: megtalálható keleten a Fehér-tenger vízgyűjtőjéig, az Ural folyóig, délen Marokkó, Kis-Ázsia, Kaukázus, Észak-Irán és az Aral-tó vízgyűjtő területén. Élőhelyének változatossága morfológiájában is megmutatkozik, ennek köszönhetően előfordulási helyein sok alfaját írták le, amelyek önállósága vitatott (Pintér & Pócsi, 2002). Ahogy Hermann Ottó (1887) fogalmaz: „minden valamire való halász tudja, hogy két teljesen egyforma pisztrángot ugyanazon víznek ugyanazon helyéről sohasem dobott ki.”

Jelenleg érvényes rendszertani besorolása (Nelson, 2006; Froese & Pauly, 2014):

Animalia – Állatok királysága

Chordata – Gerinchúrosok törzse

Vertebrata – Gerincesek altörzse

Gnathostomata – Állkapcsos gerincesek altörzs ága

Actinopterygii – Sugaras úszójú halak osztálya

Neopterygii – Újúsójú halak alosztálya

Teleostei – Valódi csontos halak tagozata

Salmoniformes – Lazacalakúak rendje

Salmonidae – Lazacok családja

Salmo trutta – faj

Salmo trutta m. fario (Linné, 1758) – alfaj

2.2.1 A sebes pisztráng morfológiája

A sebes pisztráng megnyúlt, áramvonalas teste oldalról lapított. Testhossza testmagasságának ötszöröse, általában 25-40 cm, faroknyele magas, a dorsalis és a caudalis úszók között zsírúszó található. A farokúszó homocerk, fiatal példányoknál bemetszett,

idősebbeknél csaknem egyenes. Feje tompa, testméretéhez képest kicsi. Szájnyílása széles, egészen a szem hátsó vonaláig elér, a kifejlett hímek állkapcsa horogban végződik (Ladiges & Vogt, 1965). Az első kopoltyúív 2-5 alsó és felső kopoltyútüskéje gomb, a közöttük lévőek pálcika alakúak. A pisztrángfélék vomer csont fogazottsága fontos bélyeg, a sebes pisztráng esetén a vomerlemezen 2-6, a nyelén 9-18 fog található, ezek kettős sorban helyezkednek el. Apró cycloid pikkelyei vannak, ezekből 110-120 található az oldalvonal mentén, 14-19 pedig a zsírúszó és az oldalvonal között (Terofal, 1984).

Úszósugár képlete: DIII – V 9-11, AII – IV 7-9, PI 12, VI 7-9. Csigolyáinak száma 53 és 59 között változik. Az első kopoltyúíven található tüskék száma 20 (Berinkey, 1966).

Színe nehezen meghatározható, abból kifolyólag, hogy minden egyed színezete eltér, és a környezet által nagyban meghatározott. Az árnyékoltság, a fény és a víz kémiai összetétele mind hatással van a szín kialakulására, aminek köszönhetően a faj nagy talányt jelent a taxonómusok számára. Törzsének háti része olajbarna, rajta kerek, fekete foltokkal, amik körül világos udvar is előfordulhat. A hasi rész felé haladva először szürkésebb, sárgás, majd a hasi részen fehér színű lesz. Az oldalvonal környékén a fekete foltok mellett pirosak is megjelennek, szintén világos udvarral. A hátúszó fekete, rajta kevés pötty található. Megemlítendő azonban, hogy a farokúszón nincsenek foltok, ez egyike a szivárványos és a sebes pisztráng közötti megkülönböztető jegyeknek. Az ivadékok színezete ettől különbözik, az oldalukon 8-12 ovális folt található, amelyek a második életévig a fej felől kiindulva fokozatosan eltűnnek (Pintér & Pócsi, 2002).

A faj egy jellegzetes példánya az alábbi ábrán látható. (1. ábra)



1. ábra A szilvásváradi SZ005-ös hal a jel behelyezése után (forrás: Szentés Katalin)

2.2.2 A sebes pisztráng biológiája

Jellemző előfordulási helyének, a hűvös, tiszta vizű, gyors folyású hegyi patakok pisztráng szinttájának névadó hala. A víz hőmérsékletére, ebből kifolyólag az oxigénszintjére is rendkívül érzékeny, oxigénigénye 8 mg/l. Élőhelyének fontos része a megfelelő számú búvóhely, kövek, öblök, ahonnan áldozatára les.

Ragadozó életmódot folytató állat, étrendjének fontos részei a *Gammarus* és *Asellus* rákok, tegzes lárvák, vízi csigák, vagy rovarok a vízben és a víz felett. A nagyobb egyedek halakat, békákat vagy akár apróbb emlősöket is zsákmányolhatnak.

Növekedésük a környezettől erősen függ, átlagban 25 cm hosszúra nőnek a harmadik életévig. 3-4 év után válnak ivaréretté, ivási időszakuk októbertől decemberig tart, ekkor a patakok felső részére vándorolnak. Ilyenkor a nőtények az ívóhelyen úgynevezett kotrásokat készítenek (farkukkal gödröket ásnak a mederbe), egy szaporodási időszakban akár többet is, amibe lerakják az ikrákat. Az ikrások számához képest több hím van, melyek harcolnak a szaporodási lehetőségért. Egy anya egy szezonban 200-1000 db ikrát rak le, ezek – a többi fajhoz viszonyítva nagyok – 4-5 mm átmérőjűek, a szíktől sárgás színűek. A keléshez 480-530 napfok (megközelítőleg 3 hónap) szükségeltetik, ezután az ikrából kikel a lárva. A nem táplálkozó lárva a szikzacskó felszívódásáig ebből nyeri a szükséges táplálóanyagokat, majd amikor már a vizekben megfelelő mennyiségben jelen vannak a planktonok, elkezd táplálkozni (Pintér, 1992).

Eredeti elterjedési területe Európa korábbiakban már említett részei, de gazdasági jelentősége miatt valamennyi kontinensre sikerrel betelepítették (Pintér & Pócsi, 2002). Magyarországon önfenntartó állományai kevés helyen vannak, de vándorlási hajlamának köszönhetően számos helyen megtalálható. Ezek közül néhány, a teljesség igénye nélkül: nyugaton Öreg-Duna, Mosoni-Duna, Rápce, Rába, Pinka, Gyöngyös, Apátkúti patak, Zala, Dráva, Mura; északon – észak-keleten a Sajó, a Bódva, Kémence patak, Szinva, a Szalajka és a Garadna patak (Harka & Sallai, 2004).

2.2.3 A pisztráng gazdasági jelentősége

A lazacfélék, így a pisztráng húsa is rendkívül értékes, jó fehérje-összetételű, alacsony zsírtartalmú táplálék. Vándorlása folyamatosan biztosította az emberek számára a halászati lehetőséget. Ízletességének, szálkamentességének és viszonylag jó technológiatűrésének köszönhetően ezen halfaj az elsők között volt, amikre a mesterséges

tartás és szaporítás technológiai módszereit kidolgozták. Napjainkban a világ legjelentősebb intenzív körülmények között termelt halfajai a lazacfélék családjából kerülnek ki.

A sebes pisztráng 19. század végéig Európa vezető pisztrángfaja volt, ám a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) egyszerűbb tartása, és gyorsabb növekedése miatt fokozatosan a háttérbe szorította. Napjainkban inkább természetvédelmi illetve rekreációs jelentősége van: a pisztráng a legnagyobb becsben tartott horgászhal, így az eladott mennyiség is inkább csak a patakok betelepítésére szolgál.

Magyarországon a pisztrángról szóló első bejegyzések az Árpád korból származnak. A mesterséges körülmények között való szaporításával először Nádasdy Tamás nádor foglalkozott Lékán, 1549-től (Hoitsy, 2002). A pisztrángot elsősorban a hegyvidékeken tenyésztették. Egészen az 1880-as évek elejéig állt az a nézet, miszerint a magyar tógazdálkodás sikerességének záloga a pisztrángos rendszerekben van. 1920. június 4-ig ennek megvolt az alapja, ugyanis a történelmi Magyarország hegyvidéki területei ideális környezetet jelentettek, és jelentenek ma is a pisztráng számára, azonban a trianoni békedöntés értelmében ezeket elcsatolták (Tasnádi, 2002). Napjainkban 1000-1200 km-nyi vízszakasz található Magyarországon, ami alkalmas lenne a pisztránggal való hasznosításra (Hoitsy, 2002).

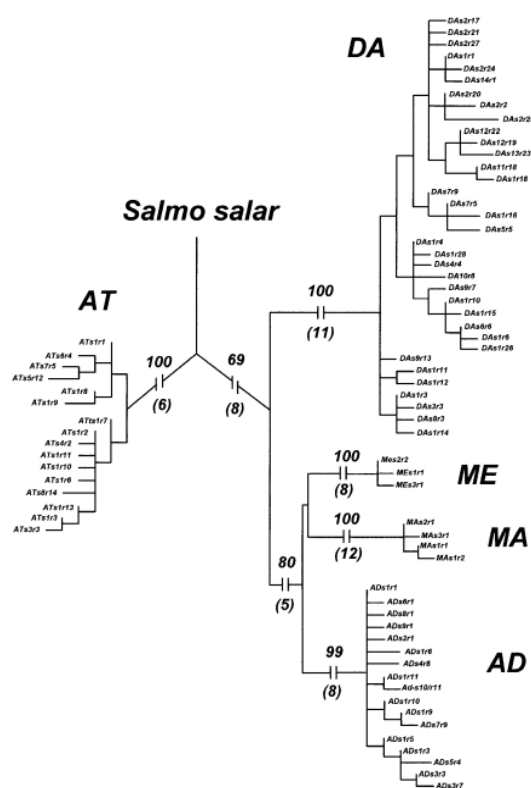
Magyarországon jelenleg csupán két helyen tenyésztik: Szilvásváradon és Lillafüreden. Az előbbi helyen elenyésző mértékben, nagyrészt nem gazdasági megfontolásból. A telep további történetére a későbbiekben térek ki. A Bükk hegység keleti részén, a Garadna patak völgyében, a Margit-forrás vizére alapozva Lillafüreden 1933 óta tenyésztik ezt a halat. Hermann Ottó 1906-os javaslatára építették, ami az 1932-es Hámori tavi halpusztulás kapcsán újra előtérbe került. Az első ikraszállítmány 1933-ban került a telepre (Hoitsy, 2002), ma az évi termelés 30-36 t körüli, aminek nagy része szivárványos pisztráng ([http1](#)). Ezen kívül pisztránggal három helyen foglalkoznak még: Visegrádon, Tapolcán és Tahitótfaluban. Itt azonban csak szivárványos pisztráng nevelése történik.

2.2.4 A sebes pisztráng vérvonalainak irodalmi háttere

A sebes pisztráng az első nem modellállat, ami felhívta a populációgenetikuskok figyelmét, illetve egyike azon első fajoknak, amelyeknek egész Európára kiterjedően

molekuláris biológiai módszerekkel vizsgálták evolúciós fejlődését (Lerceteau-Köhler et al., 2013).

Ebben a témában legátfogóbb és egyben a rendszer alappilléreinek tekinthető ismereteket Bernatchez fogalmazta meg. A 166 populációból származó, 1791 minta széles elterjedési területről származott. Kutatásai keretében a mitokondriális DNS kontroll régiójának változatossága alapján öt különböző csoportba sorolta a vizsgált egyedeket: atlanti, dunai, mediterrán, adriai és márvány. Ezek egymáshoz való viszonyát a 2. ábra szemlélteti. A fajon belüli magas fokú diverzitás okaként a széles elterjedési területén különböző földtörténeti eseményeket lehet megjelölni. A pleisztocén során bekövetkező jegesedés miatt az élőhelyek között megszűnt az összeköttetés, izolálva a populációkat, megszüntetve köztük a génáramlást. A különböző földrajzi adottságú területeken így az adott környezethez legjobban adaptálódott egyedek alakultak ki. Elsőként az atlanti, a dunai és a mediterrán vonalak különültek el, majd ez utóbbin belül az adriai és a márvány (Bernatchez, 2001). Ez utóbbit azonban ma már külön fajként tartják számon, mely mitokondriális DNS alapján még mindig közel áll a sebes pisztránghoz, és hibrid egyedeket is képesek létrehozni (Jug et al, 2005; Snoj et al, 2000).



2. ábra A sebes pisztráng vérvonalainak filogenetikai fája Bernatchez (2001) nyomán. Az ábra a mitokondriális DNS haplotípusa alapján sorolja be az egyedeket az öt fő vonalba (AT: atlanti, DA: dunai, ME: mediterrán, MA: márvány, AD: adriai). A fő vonalak mind az atlanti lazactól származtathatóak (*Salmo salar*).

A mitokondriális DNS vizsgálata mellett a mikroszatellitek vizsgálatával részletesebb eredményt kapunk a populációk összetételéről. Ennek alkalmazhatóságát vizsgálták az atlanti, az észak-afrikai, a mediterrán, és a perzsa-öböl területéről és tenyésztéssel származó egyedeken. Mikroszatellit-analízissel hasonló eredményeket kaptak, mint a mitokondriális DNS elemzésével, így ezen vizsgálat során is földrajzi elterjedésüknek megfelelően határozottan elkülönültek az előző bekezdésben említett vérvonalak, továbbá igazolták a mikroszatellitek alkalmazhatóságát a vérvonalak elkülönítésére (Presa & Guyomard, 1998).

2.2.5 Populációk elemzése genetikai markerek segítségével

A fent bemutatott ismeretek megjelenése Európa-szerte indukálta az egyes országok populációinak részletekbe menő vizsgálatát. Ezek közül az egyik legaprólékosabb és gyakorlatba is átültetett munka a szlovén populációk elemzése volt. Szlovéniában, az Adriai-tenger vízgyűjtőjéhez tartozó folyókban őshonos, és ma már a sebes pisztrángtól különálló fajként tekintett márványpisztráng (*Salmo marmoratus*) van jelen, a fennmaradását azonban nagyban veszélyezteti az atlanti sebes pisztráng vérvonal introgresszív hibridizációjával, azaz az idegen gének izoláció hiányában való keveredésével. A természetes vizekbe tenyésztetkekből kikerülő egyedek nagy része atlanti génekkel rendelkezik, keveredésük az őshonos fajjal olyan nagymértékű, hogy az 1980-as évekre csak a Soča folyó felső szakaszain lehetett tisztán márványpisztrángot találni. A folyamat leállítására és a károk enyhítésére törzstenyésztetkekből származó márványpisztrángokat helyeznek ki. A kutatók a hibridek és a fajazonos egyedek elkülönítésére dolgoztak ki módszert (Jug et al, 2005; Snoj et al, 2000).

Sušnik és munkatársai az Adriai-tenger vízgyűjtő területén őshonos sebes pisztráng populáció és az ohrid-tavi pisztráng molekuláris genetikai elemzése során a mitokondriális DNS és mikroszatellit analízisre támaszkodtak, így módon el tudták különíteni a populációkat, illetve a vérvonalakat egymástól, továbbá az állományok populációgenetikai elemzését is el tudták végezni a markerek segítségével. Ezen felül az ohrid-tavi pisztráng vitatott taxonómiai státuszát is némiképp tisztázták: az adriai vonalból 155 ezer éve kivált csoportról van szó, így nem támogatja a külön fajként való besorolást (Sušnik et al, 2007).

A franciaországi populációk eredendően atlanti származásúak. Azonban erre a területre is bekerültek nem ott kialakult egyedek a tenyésztés révén, amik kiszorították az őshonosakat. Ezeket ősi és modern jelzővel különítették el egymástól. Ezen közeli

változatok elkülönítésére mikroszatelliteket alkalmaztak. Arra jutottak, hogy ugyan a tenyésztett egyedek, a tenyészállományok egymás közötti cseréje miatt nagyobb változatosságot mutatnak, mint a természetes állományok, de az introgressziójuk az ősi vonalak génállományába károsnak tekinthető. Célszerű volna ez utóbbiakat a lehető legtisztább formában megőrizni, így biztosítva egyfajta géntartalékot a tenyésztett halaknak (Aurelle & Berrebi, 1998).

Az ausztriai vízgyűjtőn 2000-ig nem történt szisztematikus állományfelmérés. Az ország földrajzilag kivétel nélkül a Duna vízgyűjtőjébe tartozó vizekkel rendelkezik. Bernatchez egy 1992-es tanulmánya során öt mintát elemzett a Gurk folyóból, viszont ezt tenyészetekből származó hallal telepítették a múltban, így nem meglepő, hogy az eredményei alapján az atlanti csoportba sorolta. Az első átfogóbb vizsgálatra 1998-ban került sor, melynek során kimutatták a populációk atlanti fertőzöttségét, és összefüggésbe hozták a vérvonalak eltérő arányát az eljegesedés területével, valamint az élőhelyek kitettségével (Weiss et al., 2001).

Egy későbbi, 2013-as osztrák kutatás kimutatta, hogy annak ellenére, hogy az Alpok osztrák, illetve bajor része a Duna vízgyűjtőjéhez tartozik, vannak területek, ahol őshonosan előfordulnak atlanti génekkel rendelkező populációk, amik az eljegesedés során keveredhettek (Lerceteau-Köhler et al., 2013). Nagyobb felbontású vizsgálatokkal ki lehet mutatni a vérvonalakon belül is a származást: a tenyésztett vonalak cseh illetve dán vonalakkól származnak, amik az Elba gyűjtőjére vezethetők vissza. Ezekről azonban elkülönülnek a dunai területen őshonosan előforduló atlanti egyedek. Ennek alapján elfogadható az a nézet miszerint a vérvonalak keveredésének nem kizárólag antropogén okai lehetnek, azokat a természetes körülmények ugyanúgy létrehozhatták (Schenekar et al., 2014).

2.3 A felhasznált molekuláris biológiai eljárások irodalmi áttekintése

2.3.1 Polimeráz-láncreakció (PCR – Polymerase Chain Reaction)

A polimeráz-láncreakció (PCR) egy tetszőleges DNS szekvencia sokszorosítására irányuló in vitro módszer. A reakció néhány ciklusnyi ismétlése során exponenciálisan növelhető a kiindulási DNS mennyisége, így az addig alkalmazott módszerekhez képest kevesebb minta is elég a sikeres vizsgálatokhoz (Horvát, 2000; Zsolnai, 2000).

A DNS szakaszt egy hőstabil baktériumtörzsből (*Thermus aquaticus*) izolált Taq polimeráz enzim másolja. Ez az enzim magas hőmérsékleten (94 °C felett) sem denaturálódik irreverzibilisen. Hőmérsékleti optimuma 72 °C körül van, azonban 90 °C felett már csökken a hatékonysága (Erlich, 1989). (Vizsgálataink során ezt az enzimet használtuk, de más baktériumokból származók használata is elterjedt.) Az optimális működéshez elengedhetetlen a reakcióközegben a megfelelő pufferek, a másolni kívánt DNS templát, a forward- illetve reverz primerek, és az új szakasz nukleotidjait adó dNTP jelenléte (Heszky et al., 2005).

A reakciósorozat három fő, ciklusosan ismétlődő szakaszból áll: elsőként a DNS spiráljának denaturálása történik 92-96 °C-on. Ekkor a magas hőmérséklet következtében a DNS hélixet összetartó másodrendű kémiai kötések fellazulnak, megszűnnek, a spirál két szála szétválk, így a DNS szálakra már rá tudnak tapadni a primerek. A primerek 15-30 bázispár hosszúságú oligonukleotid szakaszok, amelyeket az adott reakcióra specifikusan terveznek meg. A reakció második lépéseként 35-70 °C körüli hőmérsékleten történik ezek feltapadása. Pontos értékek a primerektől függnnek, alacsonyabb hőmérsékleten ugyanis a reakció nem elég specifikus, a primerek más helyre is feltapadhat, ez pedig átermékek képződéséhez vezethet. Az optimális hőmérsékleten a primerek feltapadnak a sokszorosítandó DNS szál két – velük komplementer – végére, majd a harmadik lépésként, a polimeráz enzim optimumától függően, 72 °C-on megkezdődik a szakasz másolása (a harmadik szakasz, lánchosszabbítás vagy elongáció). Ezen reakciók ciklikus ismétlésével a kiindulási DNS mennyisége 2^x -re növelhető, ahol az x a ciklusok számát jelenti (Zsolnai, 2000).

2.3.2 Gélelektroforézis

2.3.2.1 Agaróz gélelektroforézis

A PCR reakcióban keletkezett termékeket, és a reakció sikerességét gélelektroforézissel lehet vizsgálni. Töltéssűrűség, alak és a molekulatömeg alapján lehet így elválasztani a terméket (Fésüs et al., 2000). Ilyenkor egy hordozó anyagon – ami rendszerint valamilyen nagy fajlagos felülettel rendelkező anyag (például agaróz gél) – haladnak a minták elektromos térben, a negatív pólus irányából a pozitív felé. Az agaróz gélelektroforézissel azok a nagyméretű nukleinsavak is elemezhetők, amik a poliakrilamid gélben nem tudnak vándorolni, mint például a baktériumok, élesztők cirkuláris DNS darabjai (Bálint, 2000). Hátránya a poliakrilamiddal szemben, hogy kisebb a felbontása, és

az elválasztható DNS mennyisége. A mindennapi laboratóriumi munka során a minták nukleotid tartalmának becslésére, illetve fragmentelválasztásra használható (Fésüs et al., 2000).

2.3.2.2 Kapilláris elektroforézis

A kapilláris elektroforézis célja a minta összetevőinek nagy feszültség mellett való elválasztása üveg kapillárisban. Nagy felbontóképességű kis mintaigényű módszerről van szó. A berendezés két elektrolit tartalmú kádját köti össze egy kapilláris cső, amire detektor van kapcsolva. Ez észleli az előzőleg jelölt primerrel megjelölt mintákat (Hajósné, 1999). Ennek során szabad közegben – 50 µm belső átmérőjű, 30-50 cm hosszú kapilláris csőben – halad a minta, aminek a térfogata 0,1-10 nl. A különböző fluoreszcens jelzők detektálásával bázispár pontosan meg lehet állapítani a minta hosszát. Ily módon akár 10^{-15} mol/l koncentrációjú minta is értékelhető eredményt ad (Boross & Sajgó, 2003).

2.4 Használt genetikai markerek bemutatása

A markerek olyan öröklődő jegyek/jellemzők, amik megkülönböztetik egymástól az egyedeket, fajokat, populációkat. A genetikai analízis alanyául szolgáló marker lehet bármilyen, az egyes egyedekre jellemző tulajdonság, ami felhasználható egy egyed, a tőle származó utódok vagy a belőle származó termékek azonosítására, nyomonkövetésére.

A legklasszikusabb markernek tekinthetőek a fenotípusos bélyegek (szín, testalakulás stb.), felismerésük nem jár műszer- vagy szakértelemigénnyel, így sokáig ezek jelentették az egyedek közötti különbségtétel fő eszközét. Ám ezek megítélése szubjektív, gyakran környezeti tényezőktől befolyásolt, így nem mindig szolgáltat pontos eredménnyel (Horváth, 2000). A molekuláris biológiai eljárások fejlődésével új dimenziók nyíltak egzaktabb markerek használata terén. Egy ilyen lehetőség az enzimpolimorfizmusok jelensége. A magasabb rendű élőlények fehérjéi több formában vannak jelen a szervezetben. Ezek az ún. izoenzimek, amelyek ugyanazt a feladatot látják el, csupán néhány tulajdonságukban különböznek (töltés, méret). Az ezt alapul vevő eljárások alkalmazhatósága azonban korlátozott, tekintettel az enzimek kötött szerkezetére, illetve a mutációk (bázissorrend változás) jelentette hátrányt a többi egyeddel szemben, ami miatt erős szelekciós hatásnak vannak kitéve a mutált enzimek (Horváth, 2000).

2.4.1 Molekuláris genetikai DNS markerek

A korábban említett markertípusoknál jobban használható eredményt adnak a DNS markerek. Ezek a genom szakaszainak változatai, nagyobb számúak, változatosabbak, mint a fehérjepolimorfizmusok, így több információval szolgálnak magának az örökítőanyagnak a szerkezetéről (Horvát, 2000).

Az évek során számos genetikai markertípust fedeztek fel, melyek az adott vizsgálat céljától függően alkalmazhatók. Azonban a következő alfejezetekben csak a mi vizsgálataink során alkalmazott markerek – a PCR-RFLP és mikroszatellit markerek – bemutatására térnek ki.

2.4.1.1 A PCR-RFLP markerek

PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) módszerrel pontmutációkat mutathatunk ki restrikciós emésztéssel. A kimutatás során PCR-rel specifikusan felsokszorozított DNS szakaszokat restrikciós endonukleázzal emésztjük. A PCR reakcióban kapott termék hossza azonos, így agaróz gélelektroforézissel nem megkülönböztethető, azonban esetenként különbséget tudunk tenni a felsokszorozott szakaszon található restrikciós hasító helyek megléte vagy hiánya alapján (általában a hasító helyek szekvenciájában található egy-két bázispáros eltérések, pontmutációk okozzák a különbséget). Ezt az eljárást előszeretettel alkalmazzák a mitokondriális DNS analízisére. Egy PCR reakció alkalmával felsokszorozott DNS szakasz mennyisége meglehetősen nagy, így restrikciós enzimek párhuzamos alkalmazásával a restrikciós hely különbségek gyorsan azonosíthatók és markerként alkalmazhatók (Horváth, 2000; Heszky, 2005).

2.4.1.2 A mikroszatellit-markerek

A mikroszatellit-markerek (másnéven STR-ek: Short Tandem Repeat vagy SSR-ek: Simple Sequence Repeat) a genom 1-6 bázispárnyi szakaszainak ismétlődései 50-400 bázispár hosszúságú szakaszon. A gerinceseknél dinukleotid (2 bázispárnyi) ismétlések jellemzőek, ritkábbak a tri- vagy tetranukleotid ismétlések. Az egyes allélokban az ismétlődések száma eltérő, így más-más hosszúságúak. Az őket határoló szekvenciák a genomban csak egy-egy helyen előforduló specifikus szakaszok, ezek lehetnek a primer kapcsolódási helyei a polimeráz láncreakció során, melyek lehetővé teszik

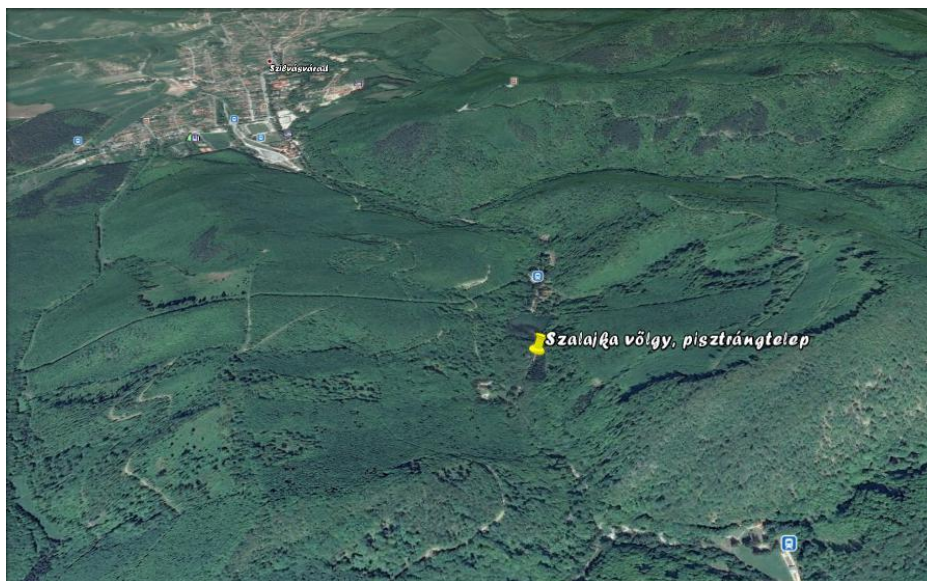
azonosíthatóságukat. A PCR-es sokszorozást követően az elválasztást kapilláris gélelektroforézissel illetve poliakrilamid gélelektroforézissel végzik (Horváth, 2000).

A mikroszatellitek igen közel állnak az „ideális” markerhez, mivel nagy számban találhatók meg a genom minden pontján, egy-egy populációban sok alléljuk lehet és viszonylag könnyen, gyorsan és olcsón kimutathatók. Gyakran ismert az elhelyezkedésük a genomban és öröklődésük kodomináns, azaz a homo- és heterozigóta mindig pontosan meghatározható (Fésüs et al. 2000). Hátrányuk, hogy a vizsgálatukhoz szükséges az amplifikálendő szakasz szekvenciájának ismerete, hogy erre lehessen primert tervezni (Heszky, 2005).

3 Módszerek

3.1 A mintavétel helyszíne és a mintázás folyamata

A mintavétel helyszíne a Bükki Nemzeti Park területén, Szilvásváradtól 1,5 km-re, a Szalajka-völgyben található pisztrángtelep volt (3. ábra). A telep állami tulajdon, kezelése magánkézből van. A tavakat a Szalajka-patak vize táplálja, a forrás közelében találhatóak, így biztosított a folyamatos tisztavíz-ellátottság, ami a szivárványos, de különösen a sebes pisztráng számára nélkülözhetetlen. A patak természetes halfaunájának is tagja a sebes pisztráng, de napjainkra – valószínűleg a megnövekedett idegenforgalomnak, és ezáltal a háborítatlan területek visszaszorulásának köszönhetően – ez az állomány töredéke a néhány évtizeddel ezelőttinek.



3. ábra A mintavételi helyszín elhelyezkedése, a háttérben Szilvásvárral (forrás: Google earth)

A szilvásvárad Szalajka-völgyben már az 1830-as évek környékén is számoltak be haltartásról, akkor még a Keglevich-birtok részeként. A pisztrángtenyésztés kezdetei a 20. század elejére tehetők, itt tartottak sebes pisztrángot addig egyedülként a csonka Magyarországon. Ezt bizonyítja egy soproni erdészhallgató az Erdészeti lapok 1929. decemberi számában megjelent élménybeszámolója tanulmányútjuk során látottakról (<http2>). „A hortobágyi tógazdaság méreteiben meghaladja egy erdőgondnok munkakörét, de műszaki berendezései és belterjes üzeme kisebb kivitelhez is értékes minta. Épp úgy,

mint Jahn Rezső erdőmester sebes pisztráng tenyésztete a csodaszép Szalajka-völgyben (Szilvásvárad uradalom) eddig az egyetlen Csonka-Magyarországon.”

A telepen a sebes pisztráng és a szivárványos pisztráng tenyésztése folyamatos. Korábban pataki szajblingot (*Salvelinus fontinalis*) illetve dunai galócát (*Hucho hucho*) is neveltek. Érdekesség, hogy ezeket Magyarországon elsőként itt sikerült kikeltetni és felnevelni. Ivadékaikat a Tisza felső szakaszán helyezték ki, a 2000-es tiszai ciánszennyezés során elpusztult állomány pótlására. A sebes pisztráng elsőként tenyésztésbe vett állományát valószínűleg a Szalajka-pataokban természetesen is előforduló egyedek tették ki. Az állományba 1945-től – feljegyzések és dolgozók beszámolója alapján – nem került be egyed idegen helyről. Sem sebes, sem szivárványos pisztráng áruhal méretben való behozatala nem történt/történik, így az ilyen szállítmányokhoz véletlenül keveredett egyedek bekerülése is kizárt. A tenyészet főként szivárványos pisztrángra specializált, növekedési és technológiai előnyei miatt, így egyedül ebből volt indokolt a behozatal vérfrissítés céljából (1972-ben és 2002-ben tenészhál méretben, illetve 2005-ben ikraként Szlovákiából). A sebes pisztráng csupán hobbiként tartott, elenyésző hányada kerül fogyasztásra.

A mintavételt 2014. március 14-én végeztük el, mely során 75 sebes pisztráng egyedet mintáztunk meg (4. ábra). A halakat 2-fenoxi-etanollal bódítottuk, majd a visszaazonosíthatóságuk érdekében passzív rádióazonosítóval láttuk el az egyedeket, és a farok alatti úszójukból mintát vettünk. Minden egyed után alkohollal fertőtlenítettük az eszközöket, hogy elkerüljük a minták szennyeződését és a halak fertőződését. A szövetdarabokat abszolút etanol tartalmazó 1,5 ml-es centrifuga csövekbe tettük és a vizsgálatok folytatásáig -20 °C-on tároltuk.



4. ábra A halak összegyűjtése a szilvásváradai pisztrángtelepen (forrás: Szentés Katalin)

3.2 Alkalmazott molekuláris genetikai módszerek

3.2.1 A DNS izolálása szövetből

Ahhoz, hogy a DNS-t vizsgálhassuk, először ki kell vonni a szövetből, megtisztítani a többi sejtalkotótól. Így a laboratóriumi vizsgálatok első lépéseként az OMEGA Biotek E.Z.N.A. Tissue DNA Kit DNS izoláló készítményét alkalmaztuk.

Első lépésként a mintákból egy nagyjából 3x3 mm nagyságú darabot vágunk le, majd eltávolítottuk belőle az alkoholt, hogy elkerüljük az emésztőenzimek hatékonyságának csökkenését. A mintákat nagy óvatossággal kezeltük, ügyelve arra, hogy az eszközök sterilek legyenek. Kesztyű használata és a csövek feliratozása elengedhetetlen volt munkánk során mind a szennyeződés, mind a minták összekeveredésének elkerülése miatt. A megmaradt szövetdarabokat visszatettük az eredeti, alkoholt tartalmazó csövekbe, majd -20 °C-on tároltuk, így a minták későbbiekben újabb vizsgálatokra is alkalmasak lesznek. A DNS izolálásához szükséges darabokat új 1,5 ml-es centrifugacsövekbe tettük, és a gyártó által ajánlott protokoll szerint jártunk el:

1. A csövekbe egyenként 200 µl TL puffert tettünk.
2. Ezekhez 25 µl OB proteáz oldatot adtunk, alaposan vortexeltük, hogy összekeveredjenek az oldat alkotói, majd 55 °C-os rázó termosztátba helyeztük „overnight” (esetünkben ez nagyjából 18 óra volt).
3. A rázó termosztátból kivéve, vortexelés után 7 percig 13 500 RPM fordulatszámon centrifugáltuk, hogy az esetlegesen jelenlevő emésztetlen szövetdarabok (úszósugár darabok, kollagén rostok) a centrifugacső aljára ülepedjenek ki. A felülúszót óvatosan felszívva – ügyelve arra, hogy a leülepedett résszel ne szennyeződjön – áttettük egy másik steril 1,5 ml-es centrifuga csőbe.
4. Ehhez 220 µl BL puffert adtunk, és vortexelés után 10 percig 70 °C-os vízfürdőben inkubáltuk.
5. A vízfürdő után 220 µl szobahőmérsékletű abszolút etanolt pipettáztunk a csövekbe, és óvatosan szuszpendálva összekevertük, hogy a vortexelés miatti DNS töredekezést elkerüljük.
6. A teljes keveréket HiBind DNA mini szűrő oszlopokba pipettáztuk át, melyet 1 percig 10 000 RPM fordulatszámon centrifugáltunk, majd gyűjtőcsőből eltávolítottuk a felesleges oldatot.

7. Az oszlopot a gyűjtőcsőbe visszahelyeztük, majd 500 µl HB puffert pipettáztunk bele, ezt 13 000 RPM fordulatszámon 1,5 percig centrifugáltuk, ezután a gyűjtőcsövet a lefolyt folyadékkal együtt kidobtuk, és az oszlopot ismét egy új gyűjtőcsőbe helyeztük.
8. A következő lépésben 700 µl DNS mosó puffert pipettáztunk a szűrőoszlopra, melyet 13 000 RPM fordulatszámon 1,5 percig centrifugáltuk, a lefolyt folyadékot kiöntöttük, majd az oszlopot ugyanabba a gyűjtőcsőbe helyeztük vissza.
9. Az előző lépést ismételtük, majd az oszlopot 4 perc 13 500 RPM fordulatszámon történő centrifugálással szárítottuk.
10. Az oszlopot steril 1,5 ml-es centrifugacsőbe tettük, majd 100 µl 70 °C-os eluáló puffert mértünk bele, és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, mely során a DNS a szűrőről a pufferbe oldódik.
11. Ezután az oszlopokat 13 000 RPM fordulatszámon 2 percig centrifugáltuk. Ezen lépés után a szűrő oszlopot eldobhatjuk, mivel a centrifugálás során a DNS-t tartalmazó eluáló puffer a centrifugacső aljára kerül.

A DNS minőségének ellenőrzésére, továbbá – mivel a következő lépésekhez ismernünk kell az izolálás során kapott DNS-koncentrációkat – az eluáló pufferben oldott DNS koncentrációját IMPLEN gyártmányú fotométerrel megmértük, illetve 1%-os agaróz gélen ellenőriztük. Ennek eredményeit a 4. táblázat és a 6. ábra mutatja. A polimeráz láncreakciókhoz minden minta koncentrációját 50 ng/µl-re állítottuk be a fotométerrel mért koncentrációk alapján.

3.2.2 Polimeráz-láncreakció és az alkalmazott markerek

Vizsgálataink során három PCR-RFLP és négy mikroszatellit markert alkalmaztunk, melyeket már többször sikeresen alkalmaztak a dunai és atlanti vérvonal elkülönítésére ezen faj esetében. A markereket és tulajdonságaikat az 1. táblázat és 2. táblázat foglalja össze.

1. táblázat Az alkalmazott PCR-RFLP markerek: CR mtDNS - Mitokondriális DNS kontroll régiója; LDH-Tejsav dehidrogenáz enzim gén részlet; SL -: Szomatolaktin gén részlet.

Marker neve	Elhelyezkedése	Emésztőenzim	Referencia
CR mtDNS	mitokondriális DNS	Fnu ₄ HI	Bernatchez & Danzmann, 1993; Susnik et al., 2001; Snoj et al., 2010
LDH-C1	sejtmagi DNS	BsII	McMeel et al., 2001
SL	sejtmagi DNS	MspI	Ford, 1998

Az első PCR-RFLP marker, a CR mtDNS vizsgálata során a primerek egy – a mitokondriális DNS kontrol régiójában található – 1088 bp hosszúságú szakaszt szintetizálnak. Ezt a szakaszt a Fnu₄HI restrikciós enzimmal emésztve az atlanti vérvonal esetén egy 434 és egy 654 bp hosszúságú terméket kapunk, a dunai allél esetén pedig nem emésztődik a szakasz. A mitokondriális DNS esetében nem alakulhat ki heterozigóta egyed, mivel az egyedek csak egyféle, az anyától örökölt mitokondriális DNS-sel, egy haplotípussal rendelkeznek.

Másik két PCR-RFLP marker a sejtmagi DNS-ben található, melyek esetében az egyedek egy apai és egy anyai alléllal rendelkeznek, így az egyedek mind a dunai, mind az atlanti allélváltozatot is hordozhatják, ekkor heterozigóta egyedről beszélünk.

Az SL marker vizsgálatánál az eredeti 1076 bp hosszúságú szakaszt MspI restrikciós enzimmal emésztjük, melynek hatására az atlanti allél esetében 213 és egy 779 bp méretű szakaszt kapunk, míg a dunai allél esetében három fragment látható 566, 277 és 213 bp nagyságban az agaróz gélelektroforézis során.

Az LDH marker esetében a polimeráz-láncreakció során egy 428 bázispárnyi fragmentet kapunk, melyet a BsII emésztőenzim az atlanti vérvonal esetén 353 és 75 bp méretű termékekre hasít, míg a dunai vérvonalú allélt nem hasítja ez az enzim.

A mikroszatellit markerek – BFRO002 (10/2), OMM 1064, Ssa 408, Sso SL 417 – a genomi DNS-ben találhatóak.

2. táblázat Az alkalmazott mikroszatellit markerek

Marker neve	Elhelyezkedése	Ismétlődő motívum	Allél mérettartomány	Fluoreszcens festék	Referencia
BFRO002 (10/2)	sejtmagi DNS	(GT) _x	110-124 bp	NED	Susnik et al., 1997
OMM 1064	sejtmagi DNS	(ACAG) _x (ACAG) ₂	163-334 bp	VIC	Rexroad et al., 2002
Ssa 408 uos	sejtmagi DNS	(GACA) _x	205-305 bp	PET	Cairney et al., 2000
Sso SL 417	sejtmagi DNS	(GT) _x	169-195 bp	FAM	Slettan et al., 1995

A mikroszatellitek analíziséhez ún. farkazott (tail) primereket használtunk. Ennél a módszernél a specifikus primerpárok egyik tagjának 5' végéhez egy 17 bp-os (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') farkat csatoltunk és a PCR reakcióban egy harmadik – a fark szekvenciájának megfelelő – fluoreszcens primert is alkalmaztunk (Shimizu et al., 2002).

A primerek bázissorrendje, a részletes reakcióelegy összetételek, és hőprofilok valamint a reakciók agaróz gélelektroforetikus ellenőrző képei a 9. *Mellékletben* található.

3.2.3 A PCR és PCR-RFLP módszerek eredményeinek kimutatása

3.2.3.1 Agaróz gélelektroforézis

A DNS-izolálás és a PCR sikerességének ellenőrzésére az agaróz gélelektroforézis módszerét használtuk. Ennek során a termék méretétől függően 1%, 1.5%, illetve 2% töménységű gél készítettünk kádmérettől függő mennyiségben. Szilárd halmazállapotú agarózt oldottunk TBE pufferben. Az előre elkészített puffer Tris (10,8 g), bórsav (10,5 g), EDTA-Na (0,93 g) 1000 ml desztillált vízben oldott elegye. Ahhoz, hogy az agaróz fel tudjon oldódni az oldatot melegíteni kellett. A 10mg/ml koncentrációjú etídium-bromidot a meleg agaróz kézmelegre hűtött oldatába cseppentettük. Ezt az elegyet a futtatókádba öntöttük, amibe előzőleg rögzítettük a fésűsorokat. A gél megszilárdulása után a fésűket óvatosan kivettük, majd a zsebekbe 5 µl PCR termék 3 µl STOP-TBE festékkel kevert mintáját töltöttük. A festék összetétele: EDTA-Na (18,6 g), sarkosyl (20 g), glicerol (200 ml), brómfenolkék (0,5 g) 1000 ml desztillált vízben oldva. Ez a festék is előre kikevert állapotban volt. Minden sor szélére 3,5 µl 100 bázispáros molekulasúly markert tettünk (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas).

A mintákat 120 V feszültség alatt futtattuk az elektroforéziskádban. 30-40 perc elteltével a gél UV fény alatt ellenőriztük, mely során a DNS láncába interkalálódott etídium-bromid láthatóvá válik, majd a képet Gene Snap szoftverrel dokumentáltunk.

3.3 Populációgenetikai számítások

A fragmentanalízis során kapott adatok populációgenetikai elemzését GenoDive version 20b22 for Mac OS X (Patrick G. Meirmans, Hollandia) szoftver segítségével végeztük. A populációk genetikai diverzitása az allélok száma és megoszlása alapján vizsgálható. Minél nagyobb az előforduló allélok száma egy populációban és minél egyenletesebb ezek eloszlása, annál változatosabb a vizsgált minta. Vizsgálat tárgya volt továbbá, hogy a populáció mennyire tesz eleget a Hardy-Weinberg egyensúly feltételeinek. Ez a tényleges és várt heterozigotitás értékkel és a kettő közötti szignifikancia szint segítségével állapítható meg. A mikroszatellitek esetében vizsgáltuk a PIC-értéket (polimorf információs tartalom), ami egy marker információtartalmát, és polimorfizmusának mértékét adja meg. Az allélok számának, illetve gyakoriságának segítségével lehet meghatározni, értéke 0 és 1 közé esik, nagyobb szám polimorfabb markert takar (Aliczky, 2007).

A Hardy-Weinberg egyensúly ideális populációkban áll fenn, a genotípus- és allélgyakoriságok értéke generációról generációra állandó. Ezek mindig Hardy-Weinberg eloszlást mutatnak, amennyiben véletlenszerű párosodásról van szó, így ha ettől eltérő értéket kapunk, az a nem véletlenszerű párosodás jele. A Hardy-Weinberg eloszlás (ideális populáció) akkor áll fenn, ha végtelen egyedszámú a populáció, véletlenszerű a párválasztás, nincs szelekció, mutáció és migráció (Pecsenye, 2006).

A várt (H_e = expected heterozygosity) és valós heterozigotitás (H_o = observed heterozygosity) a heterozigóta genotípusok arányát adja meg populáción belül. A várt heterozigotitás az allélgyakorisággal adható meg, a valós érték pedig a ténylegesen megfigyelhető heterozigóták számával. Értéke 0 és 1 közötti szám, minél nagyobb, annál nagyobb a heterozigóták aránya (Mátyás, 2002).

A p-érték (szignifikancia szint) annak a valószínűsége, hogy amennyiben a nullhipotézis (H_0) igaz, a véletlen a H_0 -nak legalább annyira ellentmondó mintát produkál, mint a ténylegesen megfigyelt minta. Egy mintában megfigyelt tulajdonságról (különbség, összefüggés stb.) akkor állíthatjuk, hogy statisztikailag szignifikáns, ha nagyobb mértékű, mint amit a véletlennek tulajdoníthatunk. Abban az esetben, ha a $p \leq 0,05$ akkor az eredmény szignifikáns (Reiczigel et al., 2010).

Az F statisztika során három fixációs indexeket számolhatunk ki (F_{IS} , F_{IT} és F_{ST}), melyekkel megbecsülhető a strukturált populációk differenciáltsága. Ezek közül az F_{IS}

értéke jellemzi a populáción belüli, azaz az egyedek közötti változatosságot. Így vizsgálatink során csak az F_{IS} indexet számoltuk ki, melynek értékéből a heterozigóta hiányra, illetve többletre tudtunk következtetni. Értéke -1 és +1 között mozoghat, a pozitív érték a heterozigóta egyedek hiányára, a negatív heterozigóta többletre utal (Pecsenye, 2006).

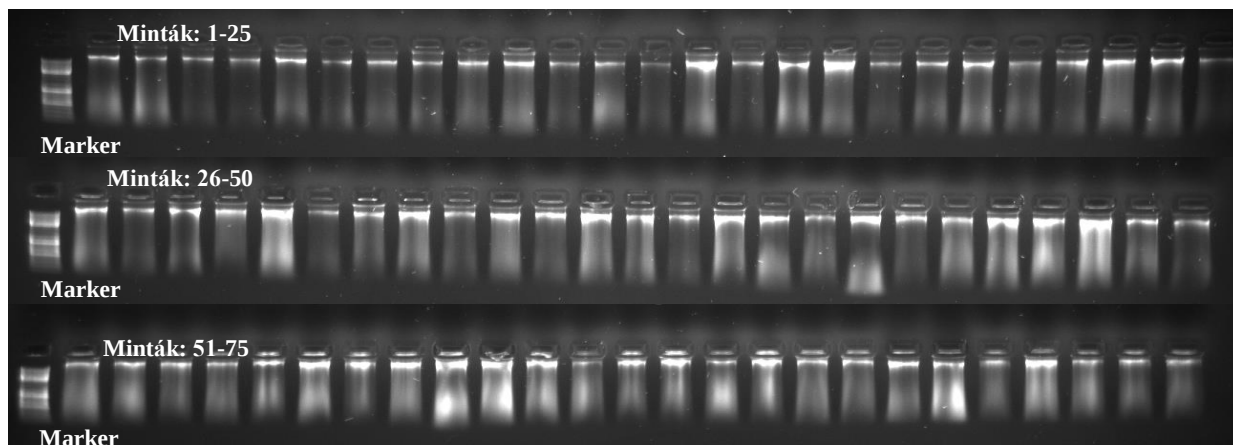
4 Eredmények

4.1 A DNS izolálás eredménye

A fotométerrel mért adatok alapján a DNS izolálása mind a 75 mintából sikeres volt. A minták DNS koncentráció és tisztasági adatait a 4. táblázat, a DNS minőségéről készült agaróz géleképet pedig a 6. ábra mutatja.

4. táblázat: A kivont DNS koncentrációja és tisztasága

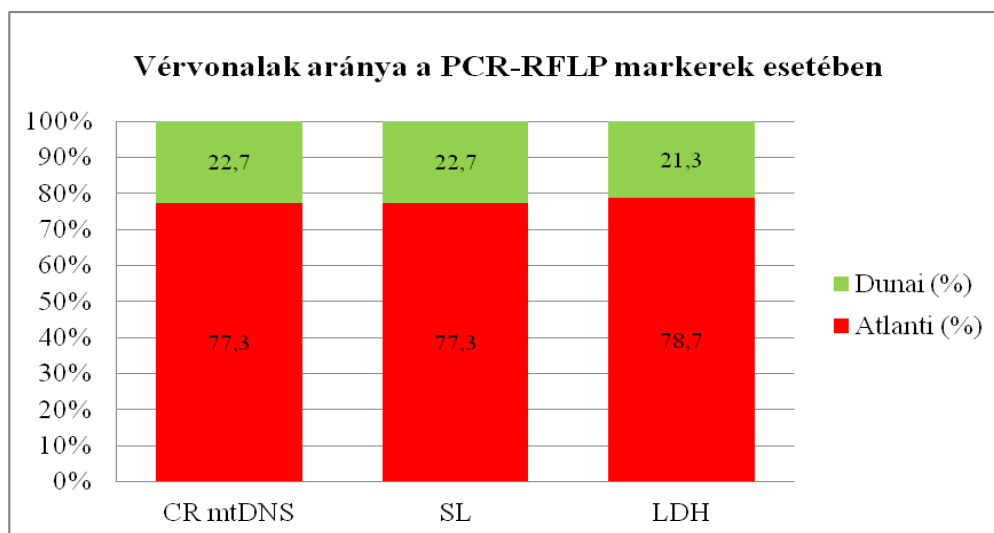
Minta	Koncentráció (ng/μl)	Tisztaság (A260/A280)	Minta	Koncentráció (ng/μl)	Tisztaság (A260/A280)
Szilvásvárads 1	220,0	2,095	Szilvásvárads 39	82,5	2,200
Szilvásvárads 2	300,0	2,182	Szilvásvárads 40	240,0	2,286
Szilvásvárads 3	102,0	1,952	Szilvásvárads 41	192,0	2,139
Szilvásvárads 4	128,0	1,962	Szilvásvárads 42	152,0	2,033
Szilvásvárads 5	278,0	2,265	Szilvásvárads 43	200,0	2,222
Szilvásvárads 6	128,0	1,962	Szilvásvárads 44	113,0	2,250
Szilvásvárads 7	155,0	2,385	Szilvásvárads 45	200,0	2,051
Szilvásvárads 8	158,0	1,853	Szilvásvárads 46	150,0	2,308
Szilvásvárads 9	215,0	2,150	Szilvásvárads 47	188,0	1,979
Szilvásvárads 10	225,0	2,250	Szilvásvárads 48	218,0	2,289
Szilvásvárads 11	142,0	2,034	Szilvásvárads 49	168,0	2,161
Szilvásvárads 12	168,0	2,048	Szilvásvárads 50	115,0	2,421
Szilvásvárads 13	132,0	2,409	Szilvásvárads 51	253,0	2,349
Szilvásvárads 14	285,0	2,192	Szilvásvárads 52	130,0	2,000
Szilvásvárads 15	172,0	2,226	Szilvásvárads 53	140,0	1,967
Szilvásvárads 16	245,0	2,130	Szilvásvárads 54	242,0	2,109
Szilvásvárads 17	192,0	2,200	Szilvásvárads 55	288,0	2,255
Szilvásvárads 18	168,0	2,161	Szilvásvárads 56	160,0	1,730
Szilvásvárads 19	152,0	2,033	Szilvásvárads 57	152,0	2,346
Szilvásvárads 20	183,0	2,281	Szilvásvárads 58	193,0	2,333
Szilvásvárads 21	168,0	1,971	Szilvásvárads 59	322,0	2,304
Szilvásvárads 22	133,0	2,208	Szilvásvárads 60	330,0	1,886
Szilvásvárads 23	290,0	2,231	Szilvásvárads 61	170,0	1,943
Szilvásvárads 24	298,0	2,204	Szilvásvárads 62	138,0	2,292
Szilvásvárads 25	168,0	2,233	Szilvásvárads 63	148,0	1,735
Szilvásvárads 26	133,0	2,304	Szilvásvárads 64	208,0	2,024
Szilvásvárads 27	158,0	2,333	Szilvásvárads 65	180,0	1,895
Szilvásvárads 28	222,0	2,119	Szilvásvárads 66	160,0	2,065
Szilvásvárads 29	110,0	2,200	Szilvásvárads 67	172,0	2,300
Szilvásvárads 30	435,0	2,320	Szilvásvárads 68	158,0	2,250
Szilvásvárads 31	87,5	2,333	Szilvásvárads 69	60,0	2,400
Szilvásvárads 32	113,0	2,143	Szilvásvárads 70	282,0	2,306
Szilvásvárads 33	232,0	2,214	Szilvásvárads 71	148,0	2,107
Szilvásvárads 34	110,0	2,316	Szilvásvárads 72	235,0	2,238
Szilvásvárads 35	210,0	2,270	Szilvásvárads 73	152,0	2,440
Szilvásvárads 36	148,0	2,107	Szilvásvárads 74	188,0	2,143
Szilvásvárads 37	198,0	2,324	Szilvásvárads 75	245,0	2,130
Szilvásvárads 38	143,0	2,280			



6. ábra: A DNS izolálás ellenőrzése 1%-os agaróz gélen elektroforézissel 100 bázispáros molekulású markerrel

4.2 A PCR-RFLP marker-vizsgálatok eredményei

Mindhárom PCR-RFLP marker (CR mtDNS, LDH, SL) esetében a polimeráz láncreakciót mindegyik mintán sikeresen elvégeztük, majd a restrikciós enzimes emésztéseket is sikeresen végrehajtottuk. Ezek eredményéről készült agaróz gélképek a 9.2 *Mellékletben* láthatóak. Az eredmények kiértékelése után kapott haplotípus- és allélgyakoriságokat a 7. ábra tartalmazza.



7. ábra: A dunai és atlanti vérvonalak aránya a PCR-RFLP markerek esetében a szilvásváradi pisztrángtelepen

A 7. ábra jól szemlélteti, hogy mindhárom marker esetében atlanti allél túlsúly van a vizsgált egyedek genomjában (77-79%). Így elmondható, hogy az atlanti vérvonal nagymértékben beépült, hibridizált az őshonos dunai vérvonallal a vizsgált populáció esetében. További tény, hogy ezen markerek esetében 21 egyednél (28%) tapasztaltuk az

atlanti allélokot homozigóta formában, míg a többi (54 darab, 72%) egyed eltérő számú atlanti alléllal rendelkezett.

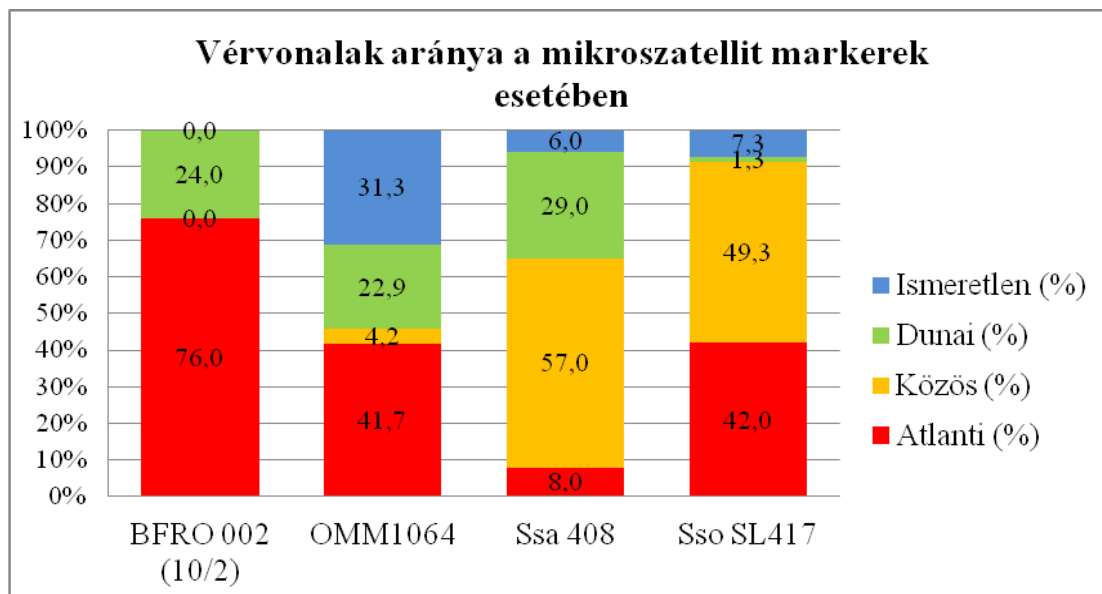
A CR mtDNS esetében 17 dunai haplotípusú egyedet találtunk, az SL markerek esetében csak 4 egyed hordozza a dunai allélokot homozigóta formában, míg az LDH esetén csak 1 egyed, azonban mindhárom markerre dunai homozigóta egyedet nem találtunk a populációban. Az egyedekhez tartozó részletes eredményeket a *Melléklet 20. táblázata* tartalmazza.

4.3 A mikroszatellit marker vizsgálatok eredményei

Mind a négy mikroszatellit marker (BFRO 002, OMM 1064, Ssa 408 uos, Sso SL 417) esetében a polimeráz láncreakciót mindegyik mintán sikeresen elvégeztük, ezek eredményéről készült agaróz géleképek a *Mellékletben* láthatók. Később a kapilláris elektroforézist is végrehajtottuk, mely során azonban a BFRO 002 (10/2), az OMM 1064 és az Ssa 408 uos lókuszt esetében számos egyednél nem kaptunk értékelhető eredményt. Ezek vagy a fluoreszcens festék beépülésének hiányából vagy az adott allél kiértékelésének nehézségeiből erednek. Ezek hiányát jelöltük a táblázatainkban, melyeket a lehetőségeinkhez mérten pótlunk.

4.3.1 A vérvonalak aránya

A vizsgálatok során kapott allélokot a korábbi irodalmak és eredmények Bogataj (2010) nyomán négy kategóriába soroltuk: atlanti, dunai, mindkettő vérvonalban megtalálható és új, ismeretlen allél, melyet még nem mutattak ki más populációkban. A mikroszatellit lókusztok alléljainak a fenti besorolás alapján számolt százalékos megoszlását a *8. ábra* szemlélteti. Az egyedekhez tartozó részletes eredményeket a *Melléklet 20. táblázata* tartalmazza.



8. ábra: A vérvonalak aránya a mikroszatellit markerek esetében a szilvásváradai pisztrángtelepen

A BFRO 002 (10/2) marker esetében csak atlanti és dunai allélok láthatóak, míg a többi marker esetében az atlanti és a dunai allélok mellett megjelennek újak, és olyanok is, amelyek mindkét vérvonalba megtalálhatóak. A BFRO 002 (10/2), az OMM 1064 és az Sso SL 417 marker esetében magas az atlanti allélok aránya a dunaihoz képest, míg az Sso SL 417 lókuszt esetében az atlanti allélok részesedése viszonylag alacsony, azonban a mindkét vérvonalba fellelhető aránya magas. Az új allélváltozatok aránya az OMM 1064 mikroszatellit esetében a legmagasabb.

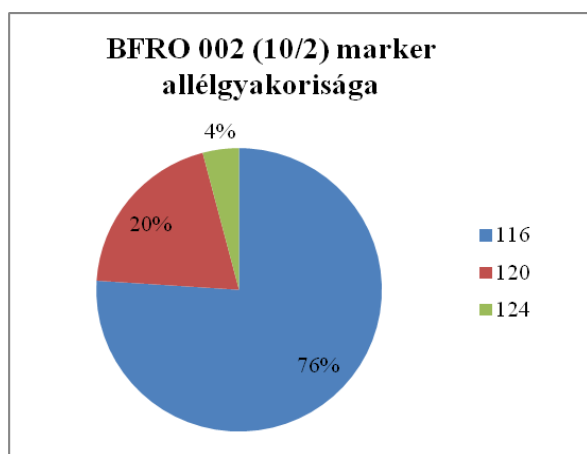
4.3.2 A mikroszatellit allélok megoszlása

Az egyes lókusztoknál talált allélokat és azok mennyiségét az 5. táblázat foglalja össze, míg a 9-12. ábrán az allélok százalékos megoszlása látható mikroszatellitenként.

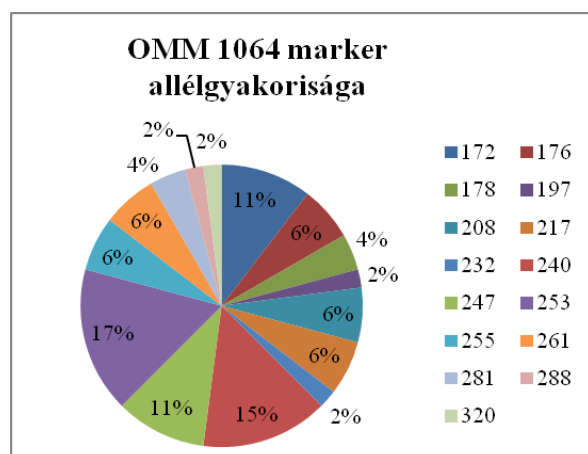
A táblázatban és az ábrákon is jól látható, hogy a legváltozatosabb marker az OMM 1064-es, mely esetében 18 különböző allélt találtunk, míg a legkevésbé polimorf marker a vizsgálatunk során a BFRO 002 (10/2) mikroszatellit, mivel ezen marker esetében csak három allél megjelenését tapasztaltuk. Ezen állításokat a 6. táblázatban található PIC értékét is alátámasztják. Ez a szám mutatja, hogy az adott marker mennyire polimorf, azaz minél nagyobb az értéke, annál polimorfabb a marker. A mi esetünkben a legmagasabb szám az OMM 1064 markernél, míg a legalacsonyabb szám a BFRO 002 (10/2) mikroszatellitnél jelenik meg.

5. táblázat: A mikroszatellit allélok megoszlása (NA: nincs adat)

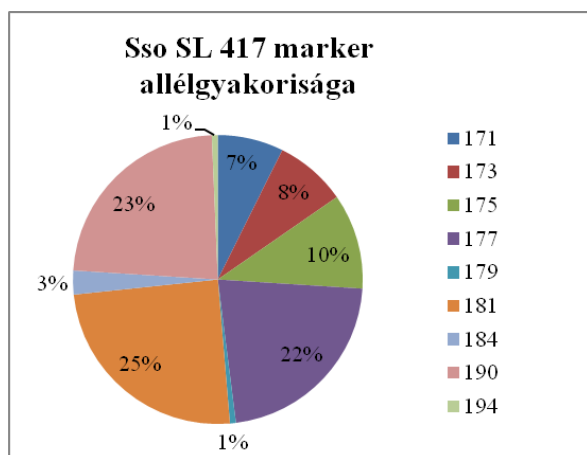
BFRO 002 (10/2)		OMM 1064		Ssa 408uos		Sso SL417	
Allél	Darabszám	Allél	Darabszám	Allél	Darabszám	Allél	Darabszám
116	111	172	5	208	1	171	11
120	29	176	3	211	3	173	12
124	6	178	2	215	4	175	16
NA	4	197	1	223	1	177	33
		208	3	227	1	179	1
		217	3	235	7	181	37
		232	1	239	23	184	4
		240	7	243	15	190	35
		247	5	247	9	194	1
		253	8	250	16		
		255	3	255	10		
		261	3	258	2		
		281	2	262	4		
		288	1	301	4		
		320	1	NA	50		
		NA	102				



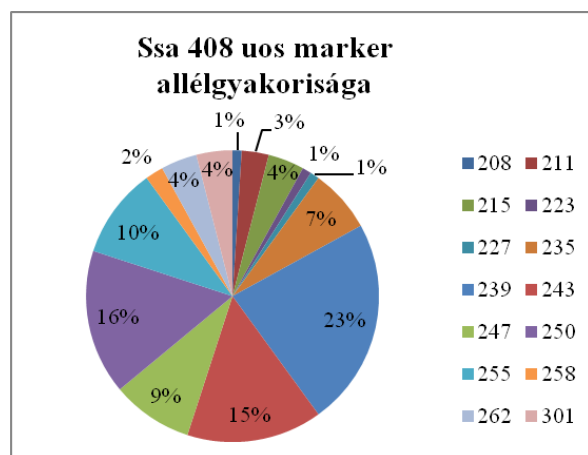
9. ábra: A BFRO 002 (10/2) mikroszatellit lókuszt allélgyakorisága a populációra nézve



11. ábra: Az OMM 1064 mikroszatellit lókuszt allélgyakorisága a populációra nézve



10. ábra: Az Sso SL 417 mikroszatellit lókuszt allélgyakorisága a populációra nézve



12. ábra: Az Ssa 408 uos mikroszatellit lókuszt allélgyakorisága a populációra nézve

6. táblázat: A mikroszatellitek PIC-értéke lókuszonként

Lókus	PIC-érték
BFRO 002 (10/2)	0,3331
OMM 1064	0,8969
Ssa 408 uos	0,8568
Sso SL 417	0,7864

4.3.3 A populációgenetikai számítások eredménye

Populációgenetikai számításokat a mikroszatellit markerek esetében érdemes végezni, mivel azok elég informatívak ezen vizsgálatokhoz a nagyszámú alléljaik miatt. A 7. táblázat a populációgenetikai szoftver által számolt heterozigotizáció értékeit és szignifikancia szintet mutatja lókuszonként, a 8. táblázat szintén ezen értékeit ismerteti a teljes populációra számolva.

Mindkét táblázatban jól látható, hogy sem lókuszonként, sem a teljes populációra nézve nincs szignifikáns különbség a tényleges és a várt heterozigotizáció között ($p > 0,05$). Így megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált populációban Hardy-Weinberg egyensúly áll fenn.

Az allélszám az egyes lókuszon található allélok tényleges számát jelenti, míg az effektív allélszám az az allélszám, ami ugyanakkora heterozigotizációt biztosít, mintha minden allél egyforma gyakorisággal volna jelen. Ez a szám nyilván alacsonyabb, mint a tényleges allélszám, hiszen sok allél igen kis gyakorisággal fordul elő, ezért kisebb mértékben is járul hozzá a genotípusok és a heterozigotizáció kialakításához.

7. táblázat: Várt és tényleges heterozigotizáció értéke, ezek szignifikancia szintje és a PIC érték lókuszonként

Lókus	Várt heterozigotizáció értéke	Tényleges heterozigotizáció értéke	Szignifikancia szint (p)	Allélszám	Effektív allélszám
BFRO 002 (10/2)	0,3835	0,3973	0,449	3	1.615
OMM 1064	0,9238	0,9167	0,560	15	10.473
Ssa 408 uos	0,8784	0,9000	0,382	14	7.669
Sso SL 417	0,8178	0,7867	0,281	9	5.329

szignifikáns különbség: $p < 0,05$

8. táblázat: Várt és tényleges heterozigotizáció értéke és ezek szignifikancia szintje a teljes populációra számolva

Populáció	Minták száma	Lókusok száma	Várt heterozigotizáció	Tényleges heterozigotizáció	Szignifikancia szint (p)	Allélok száma	Effektív allél szám
Szilvásvár	75	4	0,7509	0,7501	0,489	10,25	6,271

szignifikáns különbség: $p < 0,05$

Az F-statisztikai vizsgálatok során minden lókusznál közelítő értéket kaptunk (9. táblázat), így a populációban sem heterozigóta hiány (beltenyésztettség), sem többlet nem tapasztalható, mely alátámasztja, hogy a vizsgált populációban Hardy-Weinberg egyensúly áll fenn.

9. táblázat: F_{is} értékek lókuszonként a teljes populációra számolva

Populáció	BFRO 002 (10/2)	OMM1064	Ssa 408 uos	Sso SL 417
Szilvásvár	-0.036	0.008	-0.025	0.038

5 Értékelés és következtetések

Az általunk alkalmazott módszerekkel sikeresen kimutathatók a választott markerek, továbbá ezen markerek alkalmasak a sebespisztráng-állományok populációgenetikai felmérésére, illetve az egyedek genetikai eredetének feltárására. Az állományok genetikai hátterének nagyobb mértékű feltárására azonban javasoljuk további lókuszok vizsgálatát is.

Vizsgálataink mindkét allél – a dunai és az atlanti – jelenlétét kimutatták minden marker esetében. A dunai génhányad aránya hasonló a Tanszék által ezidáig vizsgált populációkban tapasztaltakhoz. A nagymértékű atlanti allél arány alapján feltételezhetjük, hogy ezen tenyészállomány is eredetileg az atlanti vonalból került ki, melyet a helyi patakokból bevitt egyedekkel gazdagítottak, mindez egybeesik az Európán eddig vizsgált tenyészállományok eredményeivel, azonban az állomány pontos származásáról nincs adatunk.

Az egyedek ivarát teljes biztonsággal nem tudtuk megállapítani, mivel a mintavétel ívási időszakon kívül történt. Néhány egyed adott ikrát illetve tejet a mintavételnél, csupán ezek ivara biztos, a többit fenotípus alapján soroltuk be. Tervezzük azonban az idei szaporítás során minden egyedhez hozzárendelni az ivart. Az eddig rendelkezésünkre álló adatok biztatóak: a mitokondriális DNS alapján dunai egyedek közül hét egyed nagy valószínűséggel ikrás. Ez azt jelenti, hogy ezek öröközik a dunai eredetű mitokondriális DNS-t, így ezeket az anyákat genomi DNS alapján dunai egyedekkel párosíthatjuk. Ezek lehetnek mitokondriális genom alapján atlantiak is, hiszen csak a genomi DNS-üket öröközik az utódra. Ezeket a DNS tulajdonságokat kombinálva eredményeink alapján, irányított keresztezésekkel növelhetjük a dunai gének arányát az állományon belül.

Hosszabb távú célunk egy ilyen program kidolgozása és a gyakorlatba való átültetése, illetve egy minél nagyobb dunai génhányaddal rendelkező populáció kialakítása, mely során a ritka, illetve az eddig nem publikált allélok megőrzését is tervezzük, melyek a magyarországi populációk egyedi alléljai lehetnek.

A genetikai háttér feltárása mellett az állomány főbb populációgenetikai paramétereit is kiszámítottuk, melyből megállapítottuk, hogy a populáció Hardy-Weinberg egyensúlyban van, illetve az allélok nagymértékű heterozigotitást mutatnak, az állomány egészét tekintve egészséges.

6 Összefoglalás

A sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) európai populációinak széles körű vizsgálata során öt vérvonalat különítettek el: atlanti, dunai, mediterrán, adriai, márvány, amelyek földrajzi előfordulása is nagy változatosságot mutat. Ezen ismeretek birtokában egyre világosabbá vált a genetikai szennyezés problémája, amit a tenyészetekből kikerülő, döntő többségében atlanti vérvonalú egyedek őshonos vérvonalakkal való hibridizációja jelent. A magyarországi populációk felmérése jelenleg is tart a tanszéken, így célul tűztük ki egy, ezidáig nem vizsgált magyarországi sebes pisztráng tenyészállomány eredetének és genetikai hátterének feltárását.

Vizsgálataink helyszíne a Szilvásváradon található pisztrángtelep volt. A mintavételt 2014 márciusában végeztük el, melynek során a telep sebes pisztráng tenyészállományát mintáztuk. A későbbi munkálatokhoz az állomány 75 egyedét passzív rádió azonosítóval (PIT tag) megjelöltük, és a genetikai analízishez szövetmintát gyűjtöttünk a halak farok alatti úszójából. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz DNS-t izoláltunk, majd a dunai és atlanti vonal elkülönítéséhez hét, a korábbi kutatások során már sikeresen alkalmazott genetikai markert használtunk. A markerekkel a mitokondriális DNS kontroll régióját, valamint a sejtmagi DNS-ben kódolt tejsav dehidrogenáz (LDH) és szomatolaktin (SL) gének egyes szakaszait PCR-RFLP analízissel vizsgáltuk, továbbá négy mikroszatellit lókusz (BFRO 002 (10/2), OMM 1064, Ssa 408 uos, Sso SL 417) genotipizálását végeztük el.

Az anyai öröklődésű mitokondriális DNS vizsgálati eredményei alapján az állomány kisebb hányadában jelentkezik a dunai haplotípus (23%), amely eloszlást a sejtmagi DNS markerek esetében is megfigyelhetjük (LDH: 21%, SL: 23%). A mikroszatellit lókuszok vizsgálata során szintén az atlanti (6-74%) és közös allélok (0-49%) nagyobb arányát tapasztaltuk egy kisebb mértékű dunai allélarány mellett (1-23%), azonban az OMM 1064, Ssa 408, Sso SL 417 lókuszok esetében jelentős százalékban (6-16%) jelentek meg olyan allélok, melyeket ez idáig más országokban még nem publikáltak. A főbb populációgenetikai paraméterek alapján elmondható, hogy az állomány Hardy-Weinberg egyensúlyban van, az allélok nagymértékű heterozigotizást mutatnak, az állomány egészét tekintve egészséges. A tanszéken folytatott vizsgálatok során hasonló eredményeket tapasztaltak a többi magyarországi helyszínen is.

Elemzéseink során egyértelműen dunai egyed nem különíthető el, azonban az őshonos dunai génhányad aránya növelhető az egyedi azonosító rendszer segítségével elvégezhető tudatos, célzott keresztezésekkel.

7 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik dolgozatom elkészítése során segítségemre voltak.

Szeretném megköszönni konzulenseimnek a munkám során tanúsított türelmet és segítőkészséget. Dr. Horváth Ákosnak a témajavaslatot, Dr. Kovács Balázsnak és Ősz Ágnesnek a labormunkálatok alatti támogatását, és útmutatását, amivel megkönnyítették munkámat. Köszönöm továbbá Dr. Kiss István tanár úrnak az irodalomkutatás területén nyújtott segítségét, és végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom édesapámnak, Sáfrány Lászlónak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a mintaként szolgáló egyedeket.

8 Irodalomjegyzék

- Aliczki K. (2007): Genetikai variabilitás vizsgálata réghonosult magyar lúdállományokban mikroszatellitekkel. Doktori értekezés tézisei, Debrecen, 7-8. p.
- Aurelle, D., Berrebi, P. (1998): Microsatellite markers and management of brown trout (*Salmo trutta fario*) populations in southwestern France. *Genetics Selection Evolution*, 30 (1): 75-90.p
- Bálint M.(2000): Molekuláris biológia I. Műszaki könyvkiadó, Budapest, 35-36. p
- Berinkey L. 1966: Halak – Pisces. Magyarország állatvilága (Fauna Hungariae), XX. kötet, 2. füzet – Akadémiai Kiadó, Budapest, 135 p.
- Bernatchez, L. (2001): The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55(2): 351–379. p
- Bernatchez, L.,Danzmann, R. G. (1993) Congruence in Control-Region Sequence and Restriction-Site Variation in Mitochondrial DNA of Brook Charr (*Salvelinus fontinalis Mitchill*). *Mol. Biol. Evol.* 10(5): 1002-1014. p
- Bogataj, K. (2010): Genetic analysis of native brown trout (*Salmo trutta*) populations in Slovenia. Graduation thesis, Ljubljana, 62 p
- Boross L., Sajgó M. (2003): A biokémia alapjai. Mezőgazda kiadó, Budapest, pp. 511-513.
- Cairney, 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
- Erlich, Henry A. (1989): PCR technology – Principles and application for DNA amplification. Stockton Press, New York, p 18. p
- Fésüs L., Komlósi I., Varga L., Zsolnai A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Agroiinform Kiadó és Nyomda Kft., Budapest, 25-26. p
- Ford, M. J. (1998): Testing models of migration and isolation among populations of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Evolution* 52(2):539-557. p
- Froese, R. and D. Pauly (2014): FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (08/2014)
- Hajósné Dr. Novák M. (1999): Genetikai variabilitás a növénynevelésben: Molekuláris diagnosztika, Mezőgazda Kiadó, Budapest. pp 83-85.
- Harka Á., Sallai Z. (2004): Magyarország halfaunája, Nimfea T. E., Szarvas, 2004. pp. 188-189.
- Heszky L., Fésüs L., Hornok L. (2005):Mezőgazdasági biotechnológia. Agroiinform Kiadó és Nyomda, Budapest, p. 242,

- Hoitsy Gy. (2002): A pisztráng tenyésztése és horgászata. '96 Stúdió Kft, Miskolc 11-12. p
- Horváth L., Hancz Cs., Kiss I., Mézes M., Orbán L., Ördög V., Szabó T., Szűcs I., Urbányi B., Váradi L. (2000): Halbiológia és haltenyésztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 146-153.
- 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, 381–388. p
- Ladiges W., Vogt D. (1965): Die Süßwasserfische Europas. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, 69 p.
- 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* 2013, 13:176
- Mátyás, Cs. (2002): Erdészeti - természetvédelmi genetika. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 8-9., 189 pp
- 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*) lactatedehydrogenase, LDH-C1*90 and *100 alleles. *Molecular Ecology*, 10, 29.
- Nelson, S. J. (2006): Fishes of the world. Fourth edition. John Wiley & Sons Inc, 601. p
- Pecsenye K. (2006): Populációgenetika. Pars Kft., Nagykovácsi, 86-109. p
- Pintér K., Pócsi L. (2002): Hal - Mezőgazda Kiadó, Budapest pp. 24-25.
- Presa, P., Guyomard, R. (1998): Brown trout microsatellite variation: Preliminary data. *Ciheam*, 34, 169-179. p
- Reiczigel J., Harnos A., Solymosi N. (2010): Biostatisztika nem statisztikusoknak. Pars Kft., Budapest, 160-161. p
- Rexroad III, C. E., Coleman, R. L., Gustafson, A. L., Hershberger, W. K., Kilefer, J. (2002) Development of rainbow trout microsatellite markers from repeat enriched libraries. *Marine Biotechnology*, 3, 12-16 (2002).
- 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 predominance of natural versus anthropogenic admixture. *Conservation Genetics*, DOI 10.1007/s10590-013-0561-0
- 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* (2002) 9, 173-178
- Slettan, A., Olsaker, I., Lie, Ø. (1995) Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Anim. Genet.* 26:281-282.

Snoj, A., Jug, T., Melkič, E., Sušnik, S., Pohar, J., Dovč, P., Jesenšek, D., Budihna, N., (2000): Mitochondrial and microsatellite DNS analysis of marble trout in Slovenia. *Quaderni ETP* (29) (2000), 5-11. p

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* 651:199–212.

Stansfield, William D. (1997): *Genetika – Elmélet és gyakorlat*. Panem Kft., Budapest

Sušnik, S., Snoj, A., Pohar, J., Dovč, P. (1997) The microsatellite marker (BFRO 002) characteristic for different geographically remote brown trout, *Salmo trutta* L., populations. *Animal Genetics* 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.

Sušnik S., Snoj, A., Wilson, Iain F., Mrdak, D., Weiss, S. (2007): Historical demography of brown trout (*Salmo trutta*) in the Adriatic drainage including the putative S. letnica endemic to lake Ohrid. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44 (2007) 63-76. pp

Szeberényi J. (1999): *Molekuláris sejtbológia*. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs 317-318. p

Terofal, F. (1984): *Édesvízi halak* - Magyar könyvklub, Budapest, 1997 38 p.

Weiss, S., Schlötterer, C., Waidbacher, H., Jungwirth, M. (2001): Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmo trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish – by man or nature?. *Molecular Ecology* (2001) 10, 1241-1246.

8.1 Internetes hivatkozások

http1: www.pisztrangtelep.hu

http2: www.erdeszetilapok.hu/?page=arch_view&id=2534&search=szalajka&show=1

9 Melléklet

9.1 Az alkalmazott markerek reakcióelegy összetétele és hőprofilja

10. táblázat: CR mtDNS marker PCR reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
10x Buffer (NH ₄) SO ₄	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
dNTP (2,5mM)	2 µl
Primer F (6,6 mM)	1 µl
Primer R (6,6 mM)	1 µl
BSA (250ng/ml)	2,5 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl
DNA template (50ng/ul)	5 µl
Steril MQ víz	9,3 µl
Végtérfog	25 µl

Idő	Hőmérséklet	Ismétlések száma
3 min	94 °C	1x
1 min	94°C	45x
45 sec	45°C	
1 min	72°C	
5 min	72°C	1x
Tárolási hőmérséklet	4°C	

Forward primer bázissorrendje:

GTGTTATGCTTTAGTTAAGC

Reverse primer bázissorrendje:

CACCCTTAACCTCCCAAAGCTAAG

11. táblázat: CR mtDNS marker PCR-RFLP enzim emésztés reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
pcr termék	5 µl
puffer (NEB 4)	1 µl
enzim (Fnu4HI)	0,2 µl
MQ víz	3,8 µl
Összesen	10 µl

Inkubáció:	37°C	8 h
Enzim inaktiváció:	65°C	20 min

12. táblázat: LDH marker PCR reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
10x Buffer (NH ₄) SO ₄	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
dNTP (2,5mM)	2 µl
Primer F (6,6 mM)	1 µl
Primer R (6,6 mM)	1 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl
DNA template (50ng/ul)	4 µl
Steril MQ víz	12,8 µl
Végtérfog	25 µl

Idő	Hőmérséklet	Ismétlések száma
3 min	94 °C	1x
1 min	94°C	35x
1 min	58°C	
1 min	72°C	
10 min	72°C	1x
Tárolási hőmérséklet	4°C	

Forward primer bázissorrendje:

GGCAGCCTCTTCCTCAAAACGCCCAA

Reverse primer bázissorrendje:

CAACCTGCTCTCTCCCTCTGCTGACGAA

13. táblázat: LDH marker PCR-RFLP enzimes emésztés reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
pcr termék	5 µl
puffer (NEB 3)	1 µl
enzim (Bsl I.)	0,2 µl
MQ víz	3,8 µl
Összesen	10 µl

Inkubáció:	55°C	8 h
Enzim inaktiváció:	80°C	20 min

14. táblázat: SL marker PCR reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
10x Buffer (NH ₄) SO ₄	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	2 µl
dNTP (2,5mM)	2 µl
Primer F (6,6 mM)	1 µl
Primer R (6,6 mM)	1 µl
Taq (5U/µl)	0,3 µl
DNA template (50ng/ul)	4 µl
Steril MQ víz	12,2 µl
Végtérfogat	25 µl

Idő	Hőmérséklet	Ismétlések száma
3 min	94 °C	1x
1 min 1 min 1 min	94°C 50°C 72°C	45x
5 min	72°C	1x
Tárolási hőmérséklet	4°C	

Forward primer bázissorrendje:
TGGCCCGTTGAATCCATATAAAG
Reverse primer bázissorrendje:
ACTGTGAAACACTAAGCTCTCCA

15. táblázat: SL marker PCR-RFLP enzimes emésztés reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
PCR termék	5 µl
puffer (Tango Buffer)	1 µl
enzim (Msp I)	0,3 µl
MQ víz	3,7 µl
Összesen	10 µl

Inkubáció:	37°C	8 h
Enzim inaktiváció:	65°C	20 min

16. táblázat: BFRO 002 (10/2) marker PCR reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
10x Buffer (NH ₄) SO ₄	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
dNTP (2,5mM)	2 µl
Primer F (6,6 mM)	1 µl
Primer R (6,6 mM)	1 µl
NED (floureszcens) 519 R primer (6,6 mM)	1 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl
DNA template (50ng/ul)	4 µl
Steril MQ víz	11,8 µl
Végtérfogát	25 µl

Idő	Hőmérséklet	Ismétlések száma
3 min	94 °C	1x
45 sec 1 min 1 min	94°C 57°C 72°C	35x
5 min	72°C	1x
Tárolási hőmérséklet	4°C	

Forward primer bázissorrendje:

ATGTTTTTGACTGCACTATGTATTG

Reverse primer bázissorrendje:

GGAGATAAGAGTCAACGAGGC

17. táblázat: OMM 1064 marker PCR reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
10x Buffer (NH ₄) SO ₄	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
dNTP (2,5mM)	2 µl
Primer F (6,6 mM)	1 µl
Primer R (6,6 mM)	1 µl
VIC (floureszcens) 519 R primer (6,6 mM)	1 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl
DNA template (50ng/ul)	4 µl
Steril MQ víz	11,8 µl
Végtérfogát	25 l

Idő	Hőmérséklet	Ismétlések száma
3 min	94 °C	1x
45 sec 1 min 30 sec 1 min	94°C 57°C 72°C	35x
5 min	72°C	1x
Tárolási hőmérséklet	4°C	

Forward primer bázissorrendje:

AGAATGCTACTGGTGGCTGTATTGTGA

Reverse primer bázissorrendje:

TCTGAAAGACAGGTGGATGGTTCC

18. táblázat: Ssa 408 uos marker PCR reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
10x Buffer (NH ₄) So ₄	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
dNTP (2,5mM)	2 µl
Primer F (6,6 mM)	1 µl
Primer R (6,6 mM)	1 µl
PET (floureszcens) 519 R primer (6,6 mM)	1 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl
DNA template (50ng/ul)	4 µl
steril MQ víz	11,8 µl
Végtérfog	25 µl

Idő	Hőmérséklet	Ismétlések száma
3 min	94 °C	1x
45 sec 1 min 30 sec 1 min	94°C 57°C 72°C	35x
5 min	72°C	1x
Tárolási hőmérséklet	4°C	

Forward primer bázissorrendje:
AATGGATTACGGGTACGTTAGACA
Reverse primer bázissorrendje:
CTCTTGTGCAGGTTCTTCATCTGT

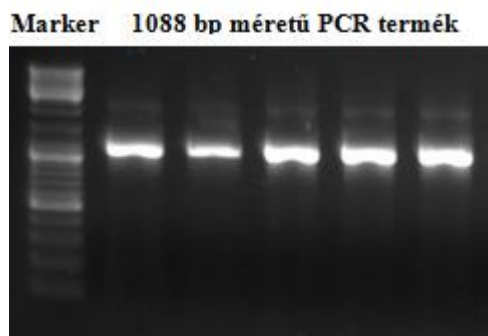
19. táblázat: Sso SL 417 marker PCR reakcióelegy összetétele és hőprofilja

Anyag megnevezése	Bemért mennyiség
10x Buffer (NH ₄) So ₄	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
dNTP (2,5mM)	2 µl
Primer F (6,6 mM)	1 µl
Primer R (6,6 mM)	1 µl
FAM (floureszcens) 519 R primer (6,6 mM)	1 µl
Taq (5U/µl)	0,2 µl
DNA template (50ng/ul)	4 µl
steril MQ víz	11,8 µl
Végtérfog	25 µl

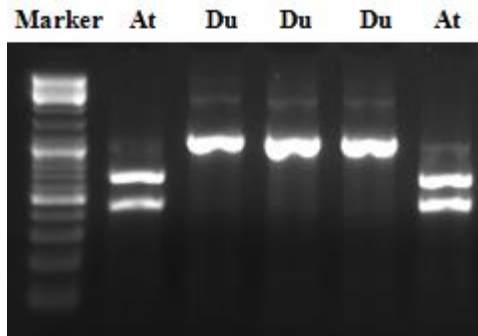
Idő	Hőmérséklet	Ismétlések száma
3 min	94 °C	1x
45 sec 1 min 1 min	94°C 57°C 72°C	35x
5 min	72°C	1x
Tárolási hőmérséklet	4°C	

Forward primer bázissorrendje:
TTGTCAGTGTATATGTGTCCCAT
Reverse primer bázissorrendje:
GATCTTCACTGCCACCTTATGACC

9.2 Az alkalmazott markerek gélképei



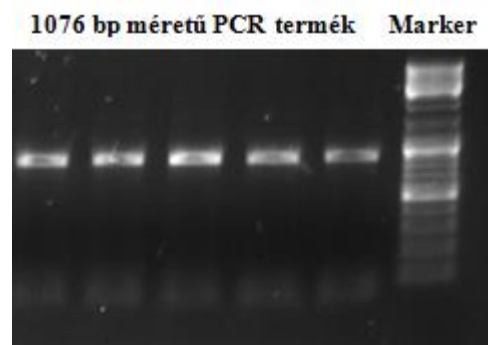
13. ábra: CR mtDNS PCR-RFLP marker polimeráz láncreakciójának eredménye agaróz gélen (példa)



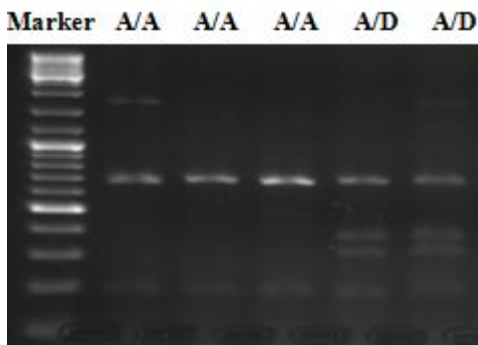
14. ábra: CR mtDNS PCR-RFLP marker Fnu4HI enzimes emésztésének eredménye agaróz gélen (példa)

At: atlanti haplotípus (654 és 434 bp),

Du: dunai haplotípus (1088 bp)



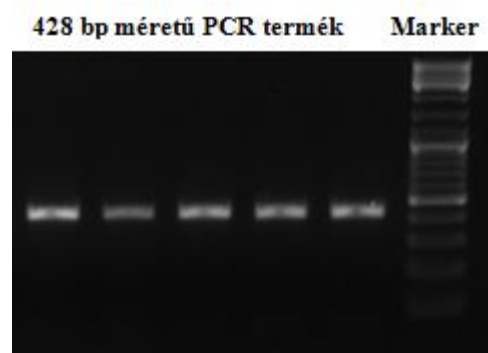
15. ábra: SL PCR-RFLP marker polimeráz láncreakciójának eredménye agaróz gélen (példa)



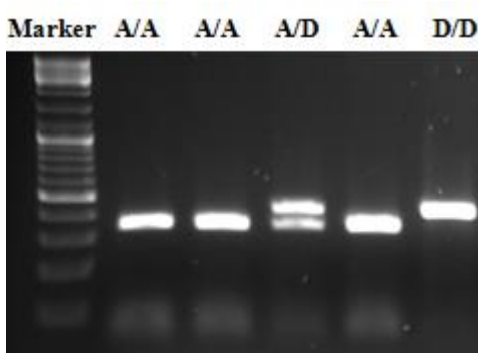
16. ábra: SL PCR-RFLP marker MspI enzimes emésztésének eredménye agaróz gélen (példa)

A: atlanti allél (779 és 213 bp),

D: dunai allél (566, 277 és 213 bp)



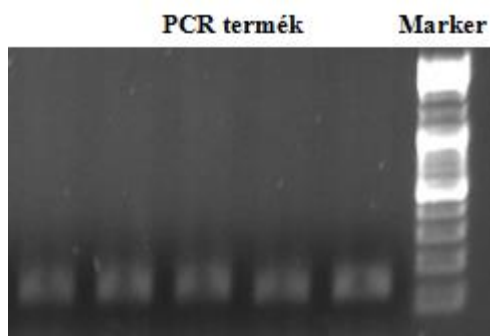
17. ábra: LDH PCR-RFLP marker polimeráz láncreakciójának eredménye agaróz gélen (példa)



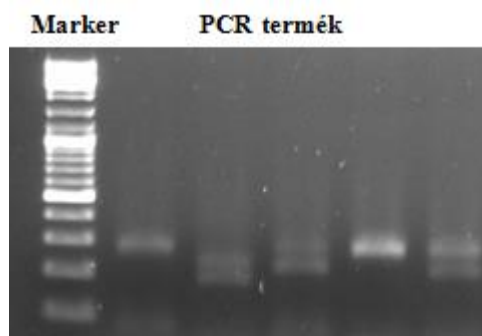
18. ábra: LDH PCR-RFLP marker BslI enzimes emésztésének eredménye agaróz gélen (példa)

A: atlanti allél (353 és 75 bp),

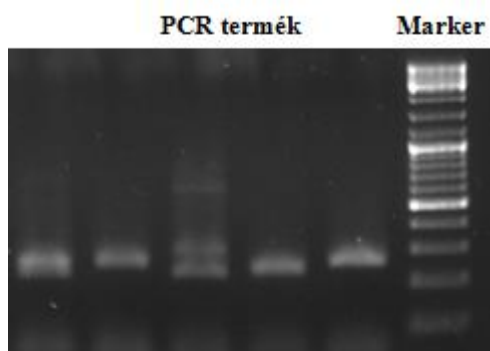
D: dunai allél (428 bp)



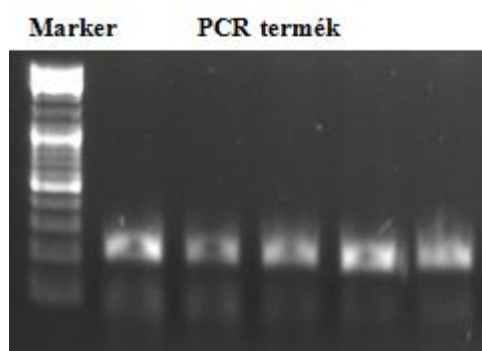
19. ábra: BFRO 002 (10/2) mikroszatellit marker polimeráz láncreakciójának eredménye agaróz gélen (példa)



20. ábra: OMM 1064 mikroszatellit marker polimeráz láncreakciójának eredménye agaróz gélen (példa)



21. ábra: Ssa 408 uos mikroszatellit marker polimeráz láncreakciójának eredménye agaróz gélen (példa)



22. ábra: Sso SL 417 mikroszatellit marker polimeráz láncreakciójának eredménye agaróz gélen (példa)

Jelmagyarázat: piros: atlanti allél, zöld: dunai allél, sárga: mindkettő vérvonalhoz tartozó allél, kék: új allél

20. táblázat: A vizsgált egyedek genotípusa

Minta	mtDNA	SL		LDH		BFRO 002		OMM1064		Ssa 408		Sso SL417	
Szilvásvár 1	100	100	100	100	100	116	120	ND	ND	ND	ND	190	190
Szilvásvár 2	200	100	100	100	100	116	116	208	208	239	243	190	190
Szilvásvár 3	200	100	100	100	200	116	120	178	208	243	250	181	190
Szilvásvár 4	200	100	200	100	200	116	116	240	261	247	255	177	177
Szilvásvár 5	100	100	200	100	100	116	116	247	253	211	243	181	190
Szilvásvár 6	100	100	100	100	200	116	120	172	253	243	250	175	181
Szilvásvár 7	100	100	100	100	100	116	124	240	253	ND	ND	190	190
Szilvásvár 8	100	100	100	100	100	116	120	ND	ND	243	258	173	181
Szilvásvár 9	100	100	100	100	100	116	116	ND	ND	ND	ND	177	190
Szilvásvár 10	200	100	100	100	100	116	120	288	320	215	255	190	190
Szilvásvár 11	200	100	200	100	100	116	120	ND	ND	235	247	181	181
Szilvásvár 12	100	200	200	100	100	116	120	ND	ND	ND	ND	173	190
Szilvásvár 13	100	100	100	100	100	116	116	176	281	247	255	173	177
Szilvásvár 14	100	100	100	100	100	116	116	ND	ND	ND	ND	171	181
Szilvásvár 15	100	100	200	100	100	120	120	ND	ND	ND	ND	171	190
Szilvásvár 16	100	100	200	100	100	116	124	ND	ND	ND	ND	177	177
Szilvásvár 17	200	100	200	100	100	116	120	217	261	ND	ND	171	177
Szilvásvár 18	100	100	100	100	200	116	116	ND	ND	243	250	177	181
Szilvásvár 19	100	100	100	100	100	116	116	ND	ND	243	258	173	181
Szilvásvár 20	100	100	100	100	200	116	120	ND	ND	ND	ND	171	190
Szilvásvár 21	100	100	100	100	200	116	120	ND	ND	239	255	171	177
Szilvásvár 22	100	100	100	100	100	116	124	ND	ND	239	239	175	184
Szilvásvár 23	200	100	100	100	100	116	116	ND	ND	243	250	173	181
Szilvásvár 24	100	100	100	100	100	116	116	172	240	ND	ND	179	181
Szilvásvár 25	100	100	100	100	100	116	116	240	261	250	262	177	190
Szilvásvár 26	100	200	200	100	200	116	116	ND	ND	223	235	177	181
Szilvásvár 27	200	100	100	100	200	116	116	ND	ND	ND	ND	175	181
Szilvásvár 28	100	100	200	100	100	116	116	247	253	227	239	177	190
Szilvásvár 29	100	100	100	100	200	116	116	ND	ND	239	243	177	181
Szilvásvár 30	100	100	100	100	200	116	124	ND	ND	239	250	175	175
Szilvásvár 31	200	100	100	100	100	116	116	ND	ND	239	239	181	190
Szilvásvár 32	100	200	200	100	100	116	116	172	240	247	255	177	181
Szilvásvár 33	100	100	200	100	100	116	120	ND	ND	243	250	177	181
Szilvásvár 34	100	100	100	100	100	120	120	ND	ND	239	301	171	177
Szilvásvár 35	200	100	200	100	200	116	120	ND	ND	250	250	190	194
Szilvásvár 36	100	100	100	100	100	116	116	ND	ND	235	243	181	190
Szilvásvár 37	100	100	200	200	200	116	116	ND	ND	ND	ND	173	175

Minta	mtDNA	SL		LDH		BFRO002		OMM1064		Ssa 408		Sso SL417	
Szilvásvár 38	100	100	200	100	200	116	116	ND	ND	243	255	173	190
Szilvásvár 39	100	100	200	100	100	120	120	ND	ND	235	262	175	181
Szilvásvár 40	100	100	100	100	200	116	116	253	281	255	301	173	177
Szilvásvár 41	100	100	200	100	200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	177	181
Szilvásvár 42	100	100	200	100	100	116	120	ND	ND	ND	ND	171	190
Szilvásvár 43	100	100	100	100	100	116	120	176	253	215	255	171	171
Szilvásvár 44	200	100	100	100	100	116	116	197	247	208	235	181	181
Szilvásvár 45	100	100	100	100	200	116	116	ND	ND	ND	ND	177	190
Szilvásvár 46	200	100	200	100	100	116	120	ND	ND	ND	ND	171	177
Szilvásvár 47	200	100	200	100	100	116	120	ND	ND	211	215	181	190
Szilvásvár 48	100	200	200	100	200	116	120	ND	ND	239	239	181	190
Szilvásvár 49	100	100	100	100	200	116	116	ND	ND	250	250	177	190
Szilvásvár 50	100	100	100	100	100	116	116	ND	ND	235	247	173	181
Szilvásvár 51	100	100	100	100	100	116	116	253	255	239	255	181	190
Szilvásvár 52	100	100	100	100	200	116	116	ND	ND	ND	ND	175	181
Szilvásvár 53	100	100	100	100	200	116	116	ND	ND	239	250	177	190
Szilvásvár 54	200	100	200	100	100	116	120	ND	ND	ND	ND	175	190
Szilvásvár 55	100	100	100	100	200	116	116	ND	ND	250	262	177	184
Szilvásvár 56	100	100	200	100	100	116	116	ND	ND	ND	ND	175	181
Szilvásvár 57	100	100	100	100	100	116	120	172	255	247	262	181	181
Szilvásvár 58	100	100	100	100	200	116	120	247	255	239	243	175	177
Szilvásvár 59	200	100	200	100	200	116	116	ND	ND	239	250	173	190
Szilvásvár 60	100	100	100	100	100	116	124	ND	ND	ND	ND	175	177
Szilvásvár 61	100	100	100	100	100	116	116	ND	ND	ND	ND	177	184
Szilvásvár 62	100	100	200	100	100	116	116	ND	ND	215	239	181	184
Szilvásvár 63	200	100	200	100	200	116	116	ND	ND	239	301	171	181
Szilvásvár 64	100	100	100	100	200	116	120	178	253	ND	ND	181	181
Szilvásvár 65	100	100	100	100	100	116	116	ND	ND	235	239	177	181
Szilvásvár 66	100	100	100	100	200	116	116	ND	ND	239	247	177	177
Szilvásvár 67	200	100	200	100	200	116	116	ND	ND	239	247	173	177
Szilvásvár 68	100	100	100	100	100	116	116	ND	ND	243	250	175	175
Szilvásvár 69	100	100	100	100	200	116	116	240	240	243	247	181	190
Szilvásvár 70	100	100	200	100	200	116	120	217	247	ND	ND	175	190
Szilvásvár 71	100	100	100	100	100	116	120	172	217	ND	ND	190	190
Szilvásvár 72	100	100	100	100	200	116	124	ND	ND	239	250	177	190
Szilvásvár 73	100	100	200	100	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	173	175
Szilvásvár 74	100	100	200	100	100	116	116	176	232	239	301	181	190
Szilvásvár 75	100	100	200	100	200	116	116	ND	ND	211	255	177	177

10 Nyilatkozat

Alulírott Sáfrány Anna Júlia a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar Állattenyésztő mérnöki BSc szak nappali tagozat második évfolyamos hallgatója nyilatkozom, hogy a TDK dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy TDK dolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar/ Intézet / Szak honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető tanszéken/intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 2014. november 2.

.....

hallgató aláírása