

OTKA PD79177 téma zárójelentése  
**Mikroszatellit markerek izolálása az akvakultúra növekedő  
jelentőségű fajainak vizsgálatához**  
(Kovács Balázs)

Napjainkban a halhús fogyasztás mértéke világszerte, míg a nagyobb és jobb minőségű választék iránti kereslet a fejlett országokban folyamatosan növekszik. Ennek következtében az akvakultúra és a halászat termelési szerkezete jelentős változás alatt van. Míg a tengeri halászatot egyre inkább a túlhalászás, a fogások ingadozása, a termelés csökkenése jellemzi, addig a tengeri és édesvízi akvakultúrából származó termelés évek óta stabilan növekszik (FAO, 2008). Ennek következtében a tenyésztett halfajok száma és az intenzív tenyésztési rendszerekben tenyészthető fajok száma is nő Európa-szerte. Az intenzív tenyésztésbe elsősorban különböző új, vagy korábban alig alkalmazott ragadozó halfajokat vontak be (Dil és Teletchea, 2008; Watson L., 2008), főként ízletes és értékes húsup miatt.

Magyarországon az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) termelés évről évre magasabb, a csapósügér (*Perca fluviatilis*) és a süllő (*Sander lucioperca L.*) produkció pedig feltehetően a közeljövőben jelentős emelkedésnek indul, az elmúlt évek tartástechnológiai fejlesztéseinek köszönhetően.

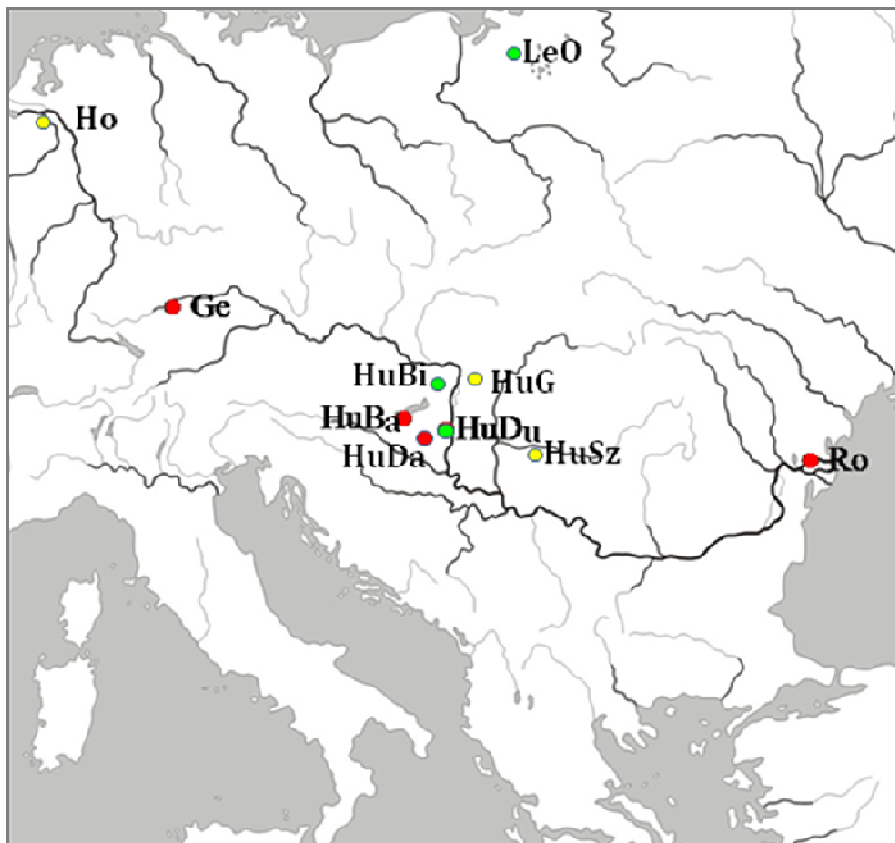
Bár a modern molekuláris genetika az utóbbi évtizedekben jelentős fejlődésen ment keresztül és eredményeinek hasznosítása az állattenyésztés egyes területein jelentős lépéseket tett előre, legtöbb halfajunkról, köztük a fent említettekről, azok populációikról, tenyésztett állományaikról és változataikról csak nagyon kevés genetikai információ áll rendelkezésünkre. Nincsenek, vagy csak nagyon kevés genomi szekvencia, és még kevesebb genetikai marker áll rendelkezésre a vizsgálatukhoz, holott ezek számos olyan lehetőséget kínálnak, melyek nagyban elősegítik a tenyésztés és a termelési technológiák hatékonyabbá tételét. Ezért mikroszatellit markereket izolálunk, ezek olyan genetikai markerek amelyek költséghatékonyan alkalmazhatóak és mai ismereteink szerint leginkább megfelelnek az ideális genetikai markerekkel szemben felállított kritériumoknak (Sunnucks, 2000) és számos genetikai probléma esetén hatékonyan alkalmazhatóak. Különösen fontosak olyan genom szekvenálási programokban nem szereplő fajok esetén, mint az általuink kiválasztott afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*), a süllő (*Sander lucioperca L.*) és csapósügér (*Perca fluviatilis*).

Munkánk kezdetéig sügérből és süllőből csupán néhány mitokondriális szekvenciát írtak le (Faber és Stepien, 1997; Sloss és mtsai., 2004; GeneBank NCBI), ami csak az erősen konzervált, anyai öröklődés menetét mutató mitokondriumok DNS állományának vizsgálatát teszi lehetővé. Ezek mellett egyetlen specifikus mikroszatellit azonosítottak a *P. fluviatilis* fajban (Zardoya és mtsai., 1996) és észak-amerikai sügérből (*Perca flavescens*) származó mikroszatellittel végeztek csapósügér populációgenetikai analízist (Behrmann-Godel és mtsai., 2004; Gerlach és mtsai., 2001; Refseth és mtsai., 1998).

Az afrikai harcsából, viszonylag tág kutatásban betöltött szerepe ellenére, csupán néhány polimorf genetikai markert izoláltak (Galbusera és mtsai., 1996), amelyeket sikeresen fel is használtak szülő-utód rokonsági kapcsolatok felderítésére (Volckaert és Hellemans, 1999). Emellett korábbi kutatásaink során

a *C. gariepinus* faj egész genomjára kiterjedő keresés eredményeként azonosítottunk két DNS markert (SCAR), amelyek potenciálisan alkalmazhatók a molekuláris ivar meghatározásában (Kovács és mtsai., 2001), továbbá egy közeli rokon fajokból a *C. batrachus* -ból írtunk le 18 mikroszatellit, azonban ennek a fajnak szemben az afrikai harcsával nincs gazdasági jelentősége. (Yue és mtsai., 2003). Kutatásunk ideje alatt azonban kínai kutatók is izoláltak új mikroszatellit markereket (Yang és mtsai., 2009). Ugyanakkor, e markerek száma még mindig kevés és a fajok populációira vonatkozóan még ma is nagyon korlátozottak az ismereteink.

A markerek izolálásához és alkalmazhatóságuk teszteléséhez mindhárom faj esetén már a program kezdetekor elkezdünk mintákat gyűjteni. Törekedtünk arra, hogy egy helyről, populációból minél nagyobb, a populációt jól reprezentáló mintamennyiséghez jussunk. Ennek során süllő mintákból sikerült négy elkülönülő populációból (Romániából, a Duna-deltából 49 db, Németországból 14 db, Magyarországról - Dalmandról 47 db és Balatonból 60 db) kellő számú mintát gyűjtenünk (1. ábra) együttműködők segítségével (a dalmandi minták kivételével valamennyi természetes populációból származott).



1. ábra: A pályázat során gyűjtött minták származási helyei: afrikai harcsa - *Clarias gariepinus* (sárga), Ho – Hollandia/Wageningen, HuG – Gödöllő, HuSz – Szarvas; Süllő - *Sander lucioperca* L. (piros), Ge – Németország, HuBa – Balaton, HuDa – Dalmand, Ro – Románia/Duna-delta; Csapósügér – *Perca fluviatilis* L. (zöld), LeO – Lengyel ország/Olsztyn populáció, HuBi – Biatorbágy, HuDu – Dunaföldvár.

Az afrikai harcsa esetén a három év alatt összesen mintegy 347 egyedi mintát gyűjtöttünk be, amelyekből 35 db Szavasról, 10 db Hollandiából (Wageningen-ből) származó farokúszó minta (valamennyi mesterséges tenyésztett populáció), 302 db pedig 3, általunk létrehozott Szarvasról származó tenyész-egyedek egyedi keresztezéséből származó lárva minta (1. ábra).

Együttműködőinknek köszönhetően csapósügerből is sikerült több populációból mintákat beszerezni, így Dunaföldvárról 43 db, Biatorbágyról 80 db, a Lengyelországi Olsztyn-ból 59 db mintát különböző populációkból (1. ábra).

Az így kialakított minta készlet mindhárom faj esetén elegendő a későbbi mikroszatellit tesztek elvégzéséhez. A süllő és sügér esetén több populációból reprezentatív, populáció vizsgálatra is alkalmas minta készletünk van, az afrikai harcsánál pedig egy F2 generációig tartó teszt keresztezésünk. Ezenkívül rendelkezésünkre áll egy süllő (*Sander lucioperca* L.) és kösüllő (*Sander volgensis*) keresztezéssel létrehozott tesztcsalád is, amely alkalmas a süllőből származó mikroszatellitek tesztelésére. Mindezek mellett sügér és süllő (F1) teszt keresztezések létrehozását is terveztük, azonban mivel az eredeti tervekhez viszonyítva, lényegesen nagyobb számú egyedről, több populációból sikerült teszt mintákat gyűjtenünk, és ezek tudományos szempontból értékesebb adatokat szolgáltathatnak nekünk, ezért ezek feldolgozására fordítottuk az erőforrásainkat.

A mintagyűjtés mellett elvégeztük a mikroszatellit dúsított könyvtárak létrehozásának optimalizálását. A dúsításra a Glenn és Schable által leírt (2005) módszer egy módosított változatát használtuk, az állatvilágban leggyakoribb ismétlődő motívum (CA dinukleotid) felhasználásával. Az optimalizálás során a módszert a saját eszközszerünkhöz alakítottuk. Ennek során mindegyik faj esetén néhány mintából nagy mennyiségű genomiális DNS-t tisztítottunk fenolkloroformos eljárással (Blin és Stafford, 1976). A genomiális DNS-t restriktáz enzimmel emésztettünk és izoláltuk a 300-1000 bp közötti fragment frakciót, majd a fragmentek „tompá” végeihez adaptert ligáltunk. Ezt követően a fragmentekhez biotinnal jelölt (CA)<sub>10</sub> próbát hibridizáltunk. A kialakult hibridizátumot streptavidinhez kapcsolt, mágnessel elkülöníthető részecskékhez kötöttük (Streptavidin-coated magnetic beads / MagneSphere<sup>R</sup>; Promega). A létrehozott komplexet többszöri átmosás után, mágnessel vontuk ki az oldatból. Az egyszálú, CA-ismétlődéssel dúsított fragmentek visszanyerését követően az adapterekről kiinduló PCR amplifikációt végeztük. A keletkezett duplaszálú termékeket pGEM-T Easy (Promega) vektorba ligáltuk, majd XL1-Blue kompetens sejtekbe transzformáltuk.

Az optimalizálás közben az összesen öt darab (afrikai harcsa - Rsa I., afrikai harcsa - Hae III., afrikai harcsa – Alu I., süllő - Rsa I., süllő - Hae III. (A faj név mögött minden esetben a genomiális DNS darabolására használt endonukleáz neve áll)) könyvtárt hoztunk létre, majd a saját technikai feltételeinkhez igazított módszerrel további hat dúsított könyvtárt csináltunk a mikroszatellitek izolálásához (afrikai harcsa esetén egy második - Rsa I., afrikai harcsa – HpyCH4V., csapósügér - Rsa I csapósügér – HpyCH4V., süllő – második RsaI. és süllő - HpyCH4V.). A három fajból összesen 11 db mikroszatellit dúsított könyvtárt készítettünk.

A könyvtárakból összesen 645 db klónt izoláltunk, amelyek közül a 364 esetében meghatároztuk az integrálódott DNS szakaszok szekvenciáját. Ezek 96%-a (337db) egyedi szekvenciát tartalmazott, azaz összességében mindössze 4%-ban kaptunk már korábban azonosított szekvenciát. Ez utóbbiak 95%-a (321 klón)

tartalmazott mikroszatellit szekvenciákat. Az adatokat fajokra lebontva az 1. táblázat mutatja.

<b>Faj név</b>	<b><i>Clarias gariepinus</i></b>	<b><i>Sander lucioperca</i></b>	<b><i>Perca fluviatilis</i></b>
<b>Vizsgált klónok száma</b>	289	216	140
<b>Szekvenált klónok száma</b>	138	115	98
<b>Egyedi szekvenciák száma</b>	131	109	93
<b>Egyedi mikroszatellit szekvencia</b>	125	101	91
<b>Mikroszatellit (PCR) primer</b>	65	44	40

1. táblázat: A mikroszatellit dúsított könyvtárak elsődleges analízise

Az adatokból látható, hogy az optimalizált dúsítási eljárás nagyon jó hatékonysággal működik, ezért a korábban tervezett könyvtárszűrést egyszerűsítettük, vagyis a klónok közül csak az inzertet nem tartalmazó klónokat szűrjük ki egy, a klónt hordozó baktérium telepéből kiinduló Colony PCR segítségével. Nem szükséges az ismétlődést hordozó szekvenciák és az egymástól eltérő klónok előzetes keresése (PIMA PCR; Lunt és mtsai. 1999), mivel a könyvtárban több mint 91%-ban egymástól különböző, mikroszatellit ismétlődést tartalmazó szekvenciákat hordoznak. A dúsítás hatékonyságának ellenére a szekvenciák egy része azonban nem alakítható mikroszatellit markerekké, vagy mert a ismétlődő DNS szakasz az inzert DNS szélén helyezkedik el, vagy mert az azt határoló szekvenciák nem alkalmasak specifikus primerek tervezésére.

Az afrikai harcra esetében 289 klónból 144 esetben határoztuk meg azok nukleotid sorrendjét. Ezek között 125 db tartalmazott ismétlődéseket. A szekvenciák alapján összesen 65 db esetén terveztünk mikroszatellit kimutatáshoz primereket. Ezeket fluoreszcens primerekkel, nagyfelbontású kapilláris gélelektroforézissel végezzük, Applied Biosystems 310, vagy 3130 Genetic Analyzer segítségével. Ezzel a módszerrel a markerek alléljai között akár 1-2 bp különbséget is ki tudunk mutatni.

A primerek egy részénél, az eredeti terveknek megfelelően, a primer párok egyik felén, az 5' végen fluoreszcens jelölést használtunk a vizsgálatok során a mikroszatellit termékek jelölésére. Később azonban a költségek csökkentése érdekében a Shimizu és munkatársai (2002) által kifejlesztett univerzális primer jelölési módszert alkalmaztuk.

Az süllőből eddig 216 klónt izoláltunk, 115 esetben határoztuk meg azok nukleotid sorrendjét. Ez utóbbiak között 101 db tartalmazott ismétlődéseket. A szekvenciák alapján összesen 44 db mikroszatellit markert terveztünk, és jellemeztünk.

A sügér esetében eddig 140 klónból, 98 esetben határoztuk meg azok nukleotid sorrendjét, amelyek közül 91 db tartalmazott ismétlődéseket. Ennél a fajnál eddig mindössze 40 primer pár tervezését végeztük el, az ingyenesen elérhető MEGA, illetve a Primer Express szoftverek segítségével.

A három fajból összesen 149 mikroszatellit kimutatásához terveztünk primereket, amelyek mindegyikénél elvégeztük a kimutatásukhoz szükséges PCR-ek optimalizálását és a markerek elsődleges tesztjét a korábban gyűjtött szövetminták segítségével. A primerek feltapadási hőmérsékletét és a PCR reakcióban alkalmazandó MgCl<sub>2</sub> koncentrációt az 1. melléklet foglalja össze.

Az eredeti terveken túl a süllő esetén 10, a sügér esetében 8 mikroszatellittel végeztünk populáció genetikai analízist az együttműködőink által rendelkezésünkre bocsájtott minták segítségével. A hét populáció 356 egyedén végzett több ezer PCR vizsgálat eredményét több populációgenetikai szoftver segítségével végeztük el (Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001); FSTAT (Goudet, 1995); Genpop (Rousset, 2008) Arlequin (Excoffier et. al., 2005)). A süllő populációk analizéséből kapott alap legfőbb mutatókat a 2., 3. és 4. táblázat, míg a sügér populációk eredményét a 5., 6., és 7. táblázat foglalja össze.

Mikroszatellit lókuszt	Populációk				Összesített
	HuDa	HuBa	Ro	Ge	
84 SI	5,830	6,533	9,383	2,857	<b>9,504</b>
146 SI	1,911	2,100	1,724	1,929	<b>1,903</b>
150 SI	1,911	1,999	1,000	1,000	<b>1933</b>
192 SI	6,238	5,482	5,829	2,000	<b>7,221</b>
195 SI	3,849	4,182	4,801	2,926	<b>4,599</b>
198 SI	1,991	1,629	2,000	3,000	<b>2,800</b>
203 SI	3,445	3,503	3,000	2,000	<b>4,205</b>
260 SI	5,962	5,337	7,165	6,857	<b>8,341</b>
268 SI	2,283	2,000	2,983	1,997	<b>2,656</b>
397 SI	1,742	2,328	1,996	4,000	<b>3,313</b>
<b>Átlag:</b>	<b>3,516</b>	<b>3,509</b>	<b>3,988</b>	<b>2,857</b>	<b>4,648</b>

2. táblázat: A süllő populációk allél gazdagsága markerenként és populációnként. (Ge: németországi, HuBa: balatoni, HuDa: dalmandi, Ro: romániai /duna-deltai/ populáció).

Populációk	H <sub>E</sub>	H <sub>E</sub> SD	H <sub>O</sub>	H <sub>O</sub> SD	Eltérés HWE-től
<b>HuD</b>	<b>0,4502</b>	± 0,0868	<b>0,3891</b>	± 0,0227	*
<b>HuB</b>	<b>0,4420</b>	± 0,0853	<b>0,4233</b>	± 0,0202	-
<b>Ro</b>	<b>0,5118</b>	± 0,0979	<b>0,4903</b>	± 0,0231	-
<b>Ge</b>	<b>0,3778</b>	± 0,0959	<b>0,3698</b>	± 0,0409	-

3. táblázat: A süllő populációk Hardy-Weinberg egyensúlya. (H<sub>E</sub>: várt heterozigotitás; H<sub>O</sub>: tapasztalt heterozigotitás; HWE: Hardy-Weinberg egyensúly; Csillag: szignifikáns eltérés P<0,05; SD: szórás. (Ge: németországi, HuBa: balatoni, HuDa: dalmandi, Ro: romániai /duna-deltai/ populáció).

<b>Populációk</b>	<b>HuD</b>	<b>HuB</b>	<b>Ro</b>	<b>Ge</b>
<b>HuD</b>	-			
<b>HuB</b>	0,0281	-		
<b>Ro</b>	0,3046	0,2914	-	
<b>Ge</b>	0,2295	0,2811	0,3466	-

4. táblázat: A süllő populációk közötti genetikai tábolságok (Nei,1983) (Ge: németországi, HuBa: balatoni, HuDa: dalmandi, Ro: romániai /duna-deltai/ populáció).

<b>Mikroszatellit lókusz</b>	<b>Populációk</b>			<b>Összes</b>
	<b>HuD</b>	<b>LeO</b>	<b>HuBi</b>	
KD_426_Pf	4,952	3,356	4,889	<b>5,606</b>
KD_427_Pf	13,804	26,935	13,508	<b>26,023</b>
KD_428_Pf	25,000	8,372	25,547	<b>30,143</b>
KD_439.479_Pf	1,000	2,576	2,000	<b>2,057</b>
<b>Átlag</b>	<b>11,189</b>	<b>10,310</b>	<b>11,486</b>	<b>15,957</b>
KD_464_Pf	-	32,000	19,687	<b>32,976</b>
KD_467.481_Pf	-	2,000	5,475	<b>5,808</b>
KD_500_Pf	-	1,000	4,950	<b>4,273</b>
KD_719_Pf	-	10,000	9,210	<b>11,824</b>
<b>Átlag</b>	-	<b>11,375</b>	<b>11,572</b>	<b>15,762</b>

5. táblázat: A sügér populációk allél gazdagsága markerenként és populációnként. Az első négy marker allélgazdagsági értékei 3 populációadatai alapján, a második négy marker két populáció egyedeire (HuDu: dunaföldvári, HuBi: biatorbágyi, LeO: lengyel országai/Olsztyn/ populációk).

<b>Populációk</b>	<b>H<sub>E</sub></b>	<b>H<sub>E</sub> SD</b>	<b>H<sub>O</sub></b>	<b>H<sub>O</sub> SD</b>	<b>Eltérés HWE-től</b>
<b>HuD</b>	<b>0,5327</b>	± 0,2103	<b>0,4488</b>	± 0,0386	*
<b>LeO</b>	<b>0,5594</b>	± 0,2012	<b>0,4788</b>	± 0,0325	*
<b>HuBi</b>	<b>0,5479</b>	± 0,2075	<b>0,4978</b>	± 0,0280	*
<b>Összes</b>	<b>0,6387</b>	± <b>0,2134</b>	<b>0,4806</b>	± <b>0,0186</b>	

6. táblázat: A sügér populációk Hardy-Weinberg egyensúlya. (H<sub>E</sub>: várt heterozigotitás; H<sub>O</sub>: tapasztalt heterozigotitás; HWE: Hardy-Weinberg egyensúly; Csillag: szignifikáns eltérés P<0,05; SD: szórás (HuDu: dunaföldvári, HuBi: biatorbágyi, LeO: lengyel országai/Olsztyn/ populációk).

<b>Populációk</b>	<b>HuD</b>	<b>LeO</b>	<b>HuBi</b>
<b>HuD</b>	0,0000	-	-
<b>LeO</b>	0,6012	0,0000	-
<b>HuBi</b>	0,1939	0,6643	0,0000

7. táblázat: A sügér populációk közötti genetikai tábolságok (Nei,1983) (HuDu: dunaföldvári, HuBi: biatorbágyi, LeO: lengyel országai/Olsztyn/ populációk).

A várt és a megfigyelt heterozigotizáció, valamint azok kapcsolata nagyon fontos, a populáció státuszára vonatkozó információk. A süllő populációk közül a balatoni, a duna-deltai és a német populációk (a 3 természetes populáció) nem térnek el a Hardy-Weinberg egyensúlytól, de a dalmati statisztikailag is szignifikáns mértékben eltér az egyensúlytól, akár csak a vizsgált sügér populációk. Mind a dalmati, mind a sügér minták tógazdaságban fenntartott, mesterségesen tenyésztett populációkból származnak. Az egyensúlytól való eltérés feltehetően a néhány generáció óta fennálló antropogén hatás, azaz a mesterséges (direkt,vagy indirekt) szelekció eredménye.

Vizsgáltuk a populációk közötti genetikai távolságokat is. A legkisebb távolságot, mindkét faj esetén a magyar populáció között találtuk, ami egyáltalán nem meglepő. A süllő populációk esetén tudtuk, hogy a dalmati populációt a Balatontól származó egyedekből alapították a sügér esetén pedig ezek között legkisebb a földrajzi távolság. A legnagyobb távolság a német és a román populáció között volt. Összességében a tapasztalt genetikai távolságok tükrözik a földrajzi távolságokat. Ugyanakkor a fenti adatok, több (jelenleg a terjedelemeire való tekintettel) nem részletezett populáció genetikai mutatóval összhangban arra utalnak, hogy a vizsgált természetes süllő populációk viszonylag „érintetlenek”.

Az eddigi kutatási eredmények és tapasztalatok alapján, munkánkat szeretnénk (legalább kis mértékben) a jövőben is folytatni, és további erőfeszítéseket tenni az eredmények és a markerek felhasználására a vizsgált fajok populációgenetikai analízisében és nemesítésében. Úgy véljük, hogy a három halfajból nyert genetikai markerek jelentős mértékben növelték a fajok vizsgálatára felhasználható molekuláris genetikai eszköztárat és a velük végzett populációgenetikai felmérések növelték a vizsgált fajokról eddig összegyűjtött tudásanyagot. Ezért tisztelettel kérjük jelentésünk pozitív értékelését és elfogadását, továbbá nagyon köszönjük az OTKA hathatós támogatását.

A munka eredményei 8 hazai és 5 nemzetközi konferencián kerültek bemutatásra, valamint több részeredmény és tapasztalat szerepel három nemzetközi tudományos, referált folyóiratban megjelent cikkben. Továbbá, 2010 és 2013 között egy TDK dolgozat, három MSc diplomamunka és várhatóan egy PhD munka készül a kapott eredményekből (lásd 2. melléklet).

Mindemellett, mivel egy cikkünk még a publikálás fázisában van, továbbá több a projektből származó eredményének a közzétételét később, 2 éven belül tervezzük, ezért tisztelettel kérjük, hogy a jelentésben foglaltak alapján születeendő minősítést szükség esetén az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeket is.

Köszönettel és tisztelettel:

Kovács Balázs

## Irodalom:

- Behrmann-Godel J, Gerlach G, Eckmann R.: Postglacial colonization shows evidence for sympatric population splitting of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L) in Lake Constance. *Mol Ecol.* 2004;13(2):491-7.
- Blin, N., Stafford, D.W., 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 3, 2303–2308
- Dil H., NL; F. Teletchea, F.:The European market of the pikeperch for consumption. Lecture at the Percid Fish Culture - From Research to Production. (Namur; Belgium) 23 - 24 January 2008 (P.:15-16)
- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Faber, J.E. and Stepien, C.A.: The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae (in) Kocher, T.D. and Stepien, C.A. (Eds.); *MOLECULAR SYSTEMATICS OF FISHES* Academic Press, San Diego, CA, USA (1997): 125-139
- FAO(2008) The state of world fisheries and aquaculture
- Galbusera, P, Volckaert. FA, Hellemans, B, Ollevier, F (1996): Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Molecular Ecology* 5, 703-705.
- Gerlach G, Schardt U, Eckmann R, Meyer A.: Kin-structured subpopulations in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.). *Heredity.* 2001;86(Pt 2):213-21.
- Glenn, T. C. and N. A. Schable. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology* 395:202-222.
- Goudet J (1995) FSTAT, Version 1.2: a computer program to calculate F statistics. *J Hered* 86: 485–486.
- Kovacs B, Egedi S, Bartfai R, Orban L. (2001) Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Genetica* 110(3):267-76.
- Lunt D.H.; Hutchinson W.F. and Carvalho G.R. (1999): An efficient method for PCR based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology* 8, 891-894
- Nei M, (1983) Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. In: *Evolution of genes and proteins* (Nei M and Koehn R, eds). Sunderland, MA: Sinauer Associates; 165–190.
- Park SDE (2001) Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [Ph.D. thesis], University of Dublin.
- Refseth UH, Nesbø CL, Stacy JE, Vøllestad LA, Fjeld E, Jakobsen KS.: Genetic evidence for different migration routes of freshwater fish into Norway revealed by analysis of current perch (*Perca fluviatilis*) populations in Scandinavia. *Mol Ecol.* 1998;7(8):1015-27.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106.
- 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, 173–178.
- Sloss BL, Billington N, Burr BM.: A molecular phylogeny of the Percidae (Teleostei, Perciformes) based on mitochondrial DNA sequence. (2004) *Mol Phylogenet Evol.*; 32(2):545-62.



- Sunnucks P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol Evol.* 2000;15:199–203.
- Volckaert, FAM, Hellemans, B (1999): Survival, growth and selection in a communally reared multifactorial cross of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 171, 49-64.
- Watson, L.:The European market for perch *Perca fluviatilis*. Lecture at the Percid Fish Culture - From Research to Production. (Namur; Belgium) 23 - 24 January 2008 (P.:10-14)
- Yang, Xinxin; Chenghui Wang; Jun Wang; Yuqing Ma; Jianguo Yin and Huixian Wu: Isolation and characterization of 12 polymorphic microsatellite loci in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) *Conserv Genet Resour* 1(1):229-231 (2009)
- Yue, G.H., B. Kovacs and L. Orban. (2003): Microsatellites from *Clarias batrachus* and their polymorphism in seven additional catfish species. *Molecular Ecology Notes.* 3: 465-468.
- Zardoya R, Vollmer DM, Craddock C, Streelman JT, Karl S, Meyer A.: Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). (1996) *Proc Biol Sci.*;263(1376):1589-98.

## 1. Melléklet:

### Az új mikroszatellitek kimutatására használt PCR reakciók javasolt anellációs hőmérsékletei és magnézium koncentrációja

Mikroszatellit lókuszt	Allél méret (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Anellációs hőmérséklet (°C)
Afrikai harcsa ( <i>Clarias gariepinus</i> ) markerek			
1.	KD 2 Cg	86-112	1,50
2.	KD 3,4 Cg	132-150	1,50
3.	KD 10K Cg	98-136	1,50
4.	KD 40 Cg	147-160	1,50
5.	KD 114 Cg	76-120	1,50
6.	KD 122 Cg/A	140-173	1,50
7.	KD 122 Cg/B	237-257	1,50
8.	KD 132 Cg	98-135	1,50
9.	KD 175 Cg	153-167	2,00
10.	KD 214 Cg	148-152	2,00
11.	KD 236 Cg	250-252	2,00
12.	KD 243 Cg	274-298	2,00
13.	KD 281 Cg	141	2,00
14.	KD 285 Cg	327	2,00
15.	KD 287 Cg	117	2,00
16.	KD 288 Cg	162-176	2,00
17.	KD 289 Cg	93-113	2,00
18.	KD 290 Cg	212-217	2,00
19.	KD 294 Cg	308-340	2,00
20.	KD 298 Cg	168-194	2,00
21.	KD 299 Cg	252-270	2,00
22.	KD 305 Cg	132	2,00
23.	KD 307 Cg	96-100	2,00
24.	KD 308 Cg	236	2,00
25.	KD 312 Cg	206-218	2,00
26.	KD 316 Cg	103-111	2,00
27.	KD 317 Cg	189	2,00
28.	KD 321 Cg	222	2,00
29.	KD 330 Cg	172-176	2,00
30.	KD 331 new Cg	218	2,00
31.	KD 332 Cg	143-145	2,00
32.	KD 336 Cg	294-296	2,00
33.	KD 337 Cg	97-105	2,00
34.	KD 339 Cg	145-166	2,00
35.	KD 341 Cg	166	2,00
36.	KD 342 Cg	148	2,00
37.	KD 344 Cg	217	2,00
38.	KD 346 Cg	151	2,00
39.	KD 348 Cg	173	2,00
40.	KD 352 Cg	228	2,00
41.	KD 353 Cg	276	2,00
42.	KD 354 Cg	216-218	2,00
43.	KD 355 Cg	125-183	3,00
44.	KD 356 Cg	264-279	2,00

Mikroszatellit lókuszt	Allél méret (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Anellációs hőmérséklet (°C)
Afrikai harcsa ( <i>Clarias gariepinus</i> ) markerek			
45.	KD 357 Cg	327-343	2,00
46.	KD 367 Cg	199-247	2,00
47.	KD 368 Cg	313	2,00
48.	KD 369 Cg	339	2,00
49.	KD 370 Cg	275-287	2,00
50.	KD 638 Cg	239-250	2,00
51.	KD 639 Cg	177-220	2,00
52.	KD 640 Cg	232	2,00
53.	KD 643 Cg	309	2,00
54.	KD 644 Cg	127-134	2,00
55.	KD 645 Cg	185-191	2,00
56.	KD 647 Cg	116-130	2,00
57.	KD 649 Cg	157-170	2,00
58.	KD 651 Cg	145-210	2,00
59.	KD 652 Cg	112-161	2,00
60.	KD 653 Cg	179-191	3,00
61.	KD 657 Cg	150-164	2,00
62.	KD 661 Cg	106-145	3,00
63.	KD 663 Cg	196-202	2,00
64.	KD 665 Cg	119-181	2,00
65.	KD 668 Cg	266	2,00
Süllő ( <i>Sander lucioperca</i> ) markerek			
66.	KD 84 SI	114-181	1,5
67.	KD 146 SI	134-144	1,5
68.	KD 150 SI	115-117	1,5
69.	KD 192 SI	190-225	2,00
70.	KD 195 SI	98-106	2,00
71.	KD 198 SI	514-527	2,00
72.	KD 203 SI	135-143	2,00
73.	KD 260 SI	169-208	2,00
74.	KD 268 SI	223-227	2,00
75.	KD 204 SI	131-162	3,00
76.	KD 373 SI	169-200	2,00
77.	KD 376 SI	105	2,00
78.	KD 379 SI	236	2,00
79.	KD 382 SI	157	2,00
80.	KD 384 SI	257-278	2,00
81.	KD 386 SI	169-229	2,00
82.	KD 387 SI	151	2,00
83.	KD 389 SI	208-242	2,00
84.	KD 390 SI	427	2,00
85.	KD 395 SI	217-253	2,00
86.	KD 397 SI	161-169	3,00
87.	KD 404 SI	330-359	2,00

Mikroszatellit lókuszt		Allél méret (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Anellációs hőmérséklet (°C)
<i>Süllő (Sander lucioperca)</i> markerek				
88.	KD 410 SI	240-263	2,00	55
89.	KD 412 SI	184-267	2,00	55
90.	KD 416 SI	91-123	3,00	55
91.	KD 417 SI	260-281	2,00	55
92.	KD 420 SI	124-144	2,00	55
93.	KD 422 SI	123-144	2,00	55
94.	KD 423 SI	144-163	2,00	55
95.	KD 424 SI	162	2,00	55
96.	KD 672 SI	107	2,00	55
97.	KD 673 SI	213	2,00	55
98.	KD 676 SI	204	2,00	55
99.	KD 682 SI	213	2,00	55
100.	KD 686 SI	107	2,00	55
101.	KD 687 SI	167	2,00	55
102.	KD 698 SI	182	2,00	55
103.	KD 701 SI	273	2,00	55
104.	KD 703 SI	133	2,00	55
105.	KD 704 SI	234	2,00	55
106.	KD 705 SI	248	2,00	55
107.	KD 706 SI	152	2,00	55
108.	KD 707 SI	106-110	2,00	55
109.	KD 711 SI	184	2,00	55
<i>Sügér (Perca fluviatilis)</i> markerek				
110.	KD 213 Pf	185	2,00	55
111.	KD 274 Pf new	372	2,00	55
112.	KD 426 Pf	148-160	2,00	55
113.	KD 427 Pf	153-271	2,00	55
114.	KD 428 Pf	89-227	3,50	55
115.	KD 432 Pf	102	2,00	55
116.	KD 434 Pf	115	2,00	55
117.	KD 439 Pf	185-191	3,00	55

Mikroszatellit lókuszt		Allél méret (bp)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Anellációs hőmérséklet (°C)
<i>Sügér (Perca fluviatilis)</i> markerek				
118.	KD 441 Pf	111	2,00	55
119.	KD 448 Pf	205	2,00	55
120.	KD 449 Pf	236	2,00	55
121.	KD 450 Pf	226	2,00	55
122.	KD 451 Pf	165	2,00	55
123.	KD 455 Pf	171	2,00	55
124.	KD 456 Pf	246	2,00	55
125.	KD 464 Pf	169-275	2,00	55
126.	KD 466 Pf	130	2,00	55
127.	KD 467 Pf	136-144	2,00	55
128.	KD 471 Pf	160	2,00	55
129.	KD 477 Pf	258	2,00	55
130.	KD 484 Pf	167	2,00	55
131.	KD 485 Pf	178	2,00	55
132.	KD 488 Pf	221	2,00	55
133.	KD 491 Pf	196	2,00	55
134.	KD 494 Pf	211	2,00	55
135.	KD 495 Pf	165	2,00	55
136.	KD 500 Pf	120-133	3,00	52
137.	KD 716 Pf	136	2,00	55
138.	KD 719 Pf	125-155	2,00	55
139.	KD 723 Pf	116	2,00	55
140.	KD 725 Pf	222	2,00	55
141.	KD 726 Pf	141	3,00	55
142.	KD 728 Pf	198	2,00	55
143.	KD 729 Pf	203	2,00	55
144.	KD 730 Pf	205	2,00	55
145.	KD 731 Pf	218	2,00	55
146.	KD 732 Pf	205	2,00	55
147.	KD 737 Pf	361	2,00	55
148.	KD 739 Pf	179	2,00	55
149.	KD 745 Pf	219	2,00	55

## 2. Melléklet:

### A Kutatási anyagból készült/készülő PhD., TDK. és MSc. dolgozatok:

- Kánainé Sipos Dóra: MIKROSZATELLIT MARKEREK IZOLÁLÁSA HAL POPULÁCIÓK GENETIKAI VARIABILITÁS VIZSGÁLATÁNAK, TÉRKÉPEZÉSÉNEK ÉS NEMESÍTÉSÉNEK MEGALAPOZÁSÁHOZ. Szent István Egyetem, Állattenyésztés-Tudományi Doktori Iskola, PhD dolgozat, végzés várható időpontja: 2013. (témavezető: Dr. Kovács Balázs)
- Balogh Endre: MIKROSZATELLIT MARKEREK IZOLÁLÁSA AFRIKAI HARCSEA (*CLARIAS GARIEPINUS*) GENOMJÁBÓL. Szent István Egyetem, TDK dolgozat 2010. (konzulensek: Dr. Urbányi Béla, Dr. Kovács Balázs)
- Balogh Endre: MIKROSZATELLIT MARKEREK IZOLÁLÁSA AFRIKAI HARCSEA (*CLARIAS GARIEPINUS*) GENOMJÁBÓL, diplomamunka, Szent István Egyetem, Agrármérnök MSc szak, végzett: 2011. június. (konzulensek: Dr. Kovács Balázs, Kánainé Sipos Dóra)
- Labbancz Tamás: MIKROSZATELLIT MARKEREK IZOLÁLÁSA SÜLLŐ (*SANDER LUCIOPERCA*) POPULÁCIÓK GENETIKAI VARIABILITÁS VIZSGÁLATÁNAK ÉS NEMESÍTÉSÉNEK MEGALAPOZÁSÁHOZ, diplomamunka, Szent István Egyetem, Mezőgazdasági Biotechnológus MSc szak., Állatbiotechnológia szakirány, végzett: 2012. június. (konzulensek: Dr. Kovács Balázs, Kánainé Sipos Dóra)
- Péli Máté: MIKROSZATELLIT MARKEREK IZOLÁLÁSA SÜGÉR (*PERCA FLUVIATILIS*) POPULÁCIÓK GENETIKAI VARIABILITÁS VIZSGÁLATÁNAK, ÉS NEMESÍTÉSÉNEK MEGALAPOZÁSÁHOZ, Szent István Egyetem, Mezőgazdasági Biotechnológus MSc szak., Állatbiotechnológia szakirány, végzés várható időpontja: 2013. december. (konzulensek: Dr. Kovács Balázs, Kánainé Sipos Dóra)