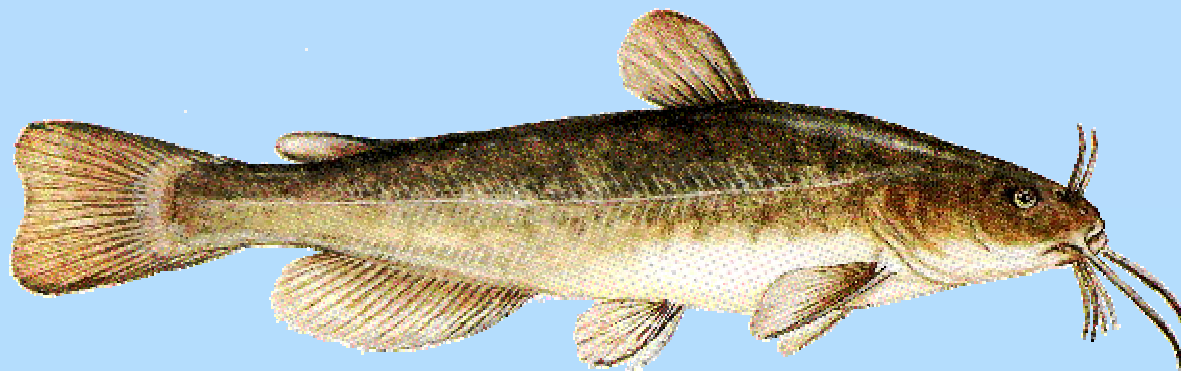


Molekuláris genetikai vizsgálatok törpeharcsa populációkon



Béres Beatrix¹, Müller Tamás¹, Bakos Katalin^{1,2},
Urbányi Béla^{1,2}, Kovács Balázs^{1,2}

¹ Szent István Egyetem, MKK-KTI, Halgazdálkodási Tanszék

² Szent István Egyetem, Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont

HAKI napok 2010.



ELŐZMÉNYEK 1.

- A törpeharcsákat a 19.században hozták be Európába (1871-1885 Franciaország, Belgium, Németország).
 - fekete törpeharcsa (*Ameiurus melas*)
 - barna törpeharcsa (*Ameiurus nebulosus*)
 - sárga törpeharcsa (*Ameiurus natalis*)
- 1902-ben került be Magyarországra (Iharos- Halászat, 1954).
 - fekete törpeharcsa
 - barna törpeharcsa
- É-Am –ban természetes körülmények közötti hibridizációjuk nem vagy csak kevésbé ismert (Taylor 1969).
- Mo-n A. nebulosus megváltozását írták le morfológiai bélyegek alapján (Harka és Pintér, 1990).
- E fajokról nagyon kevés genetikai információval rendelkezünk.



CÉLKITŰZÉS

- Magyarországra eredetileg behozott fajok azonosítása.
 - az anyai öröklődés menetét mutató mtDNS szekvenciáját vizsgáljuk
- A fajok és hibridek azonosítására megbízható vizsgálati módszer kidolgozása.
- Hibridek előfordulásának igazolása.
 - sejtmagi DNS vizsgálatokat
- Több magyarországi természetes vízi, illetve tógazdaságban megtalálható állomány morfológia és genetikai vizsgálata.



MINTAGYŰJTÉS 1.

Szent István Egyetem, MKK-KTI
Halgazdálkodási Tanszék

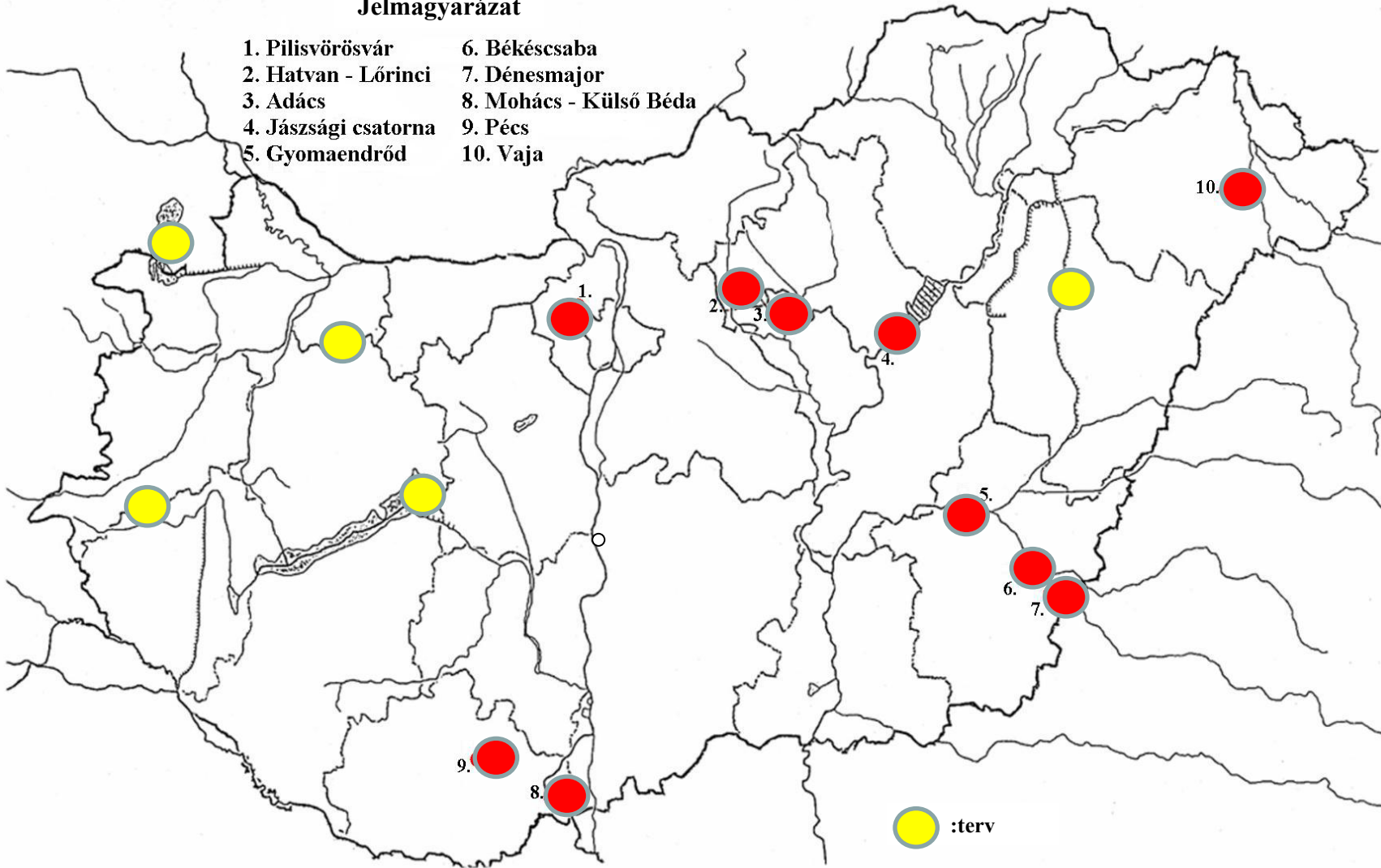




MINTAGYŰJTÉS 2.

Jelmagyarázat

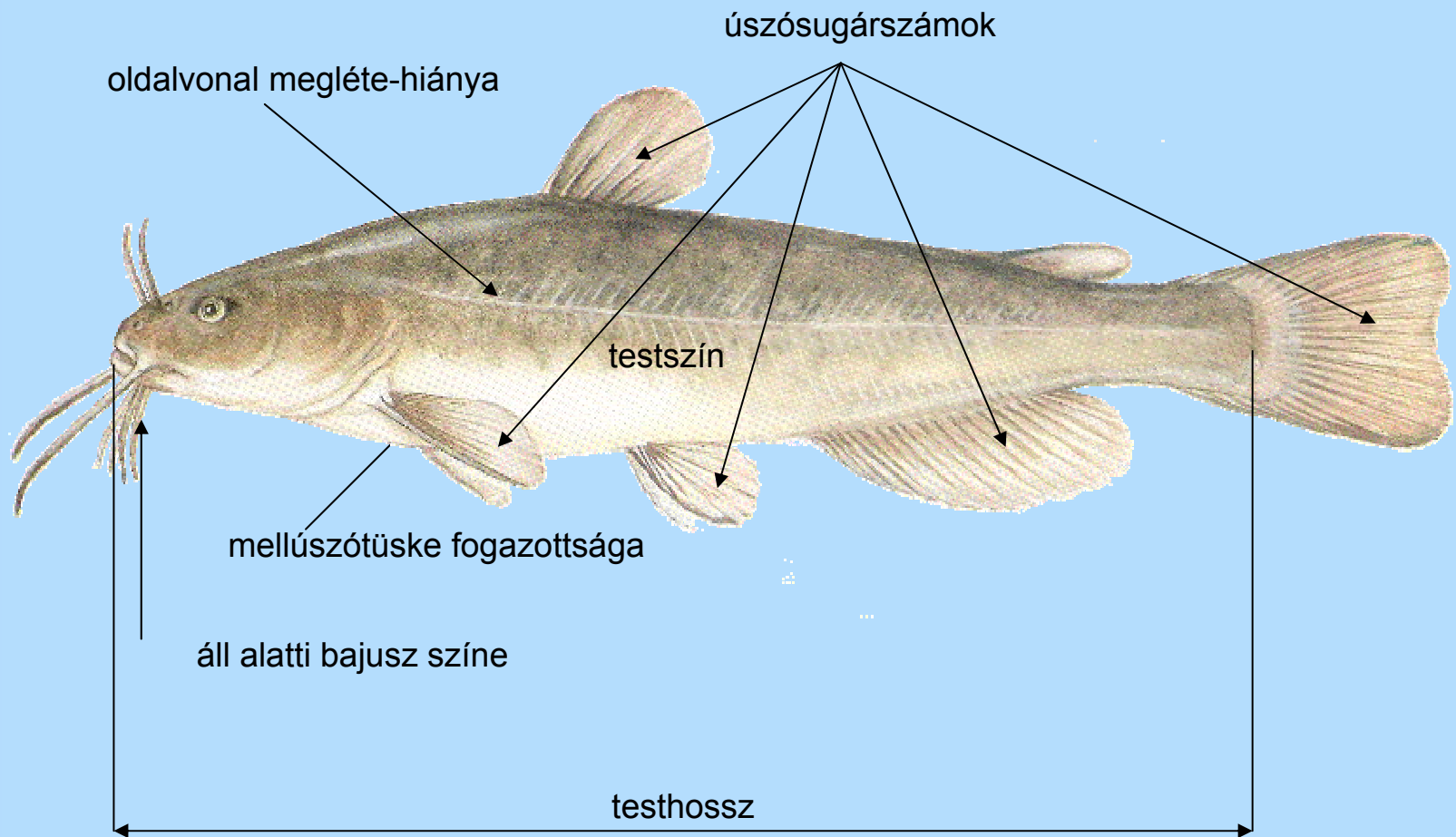
- | | |
|----------------------|------------------------|
| 1. Pilisvörösvár | 6. Békéscsaba |
| 2. Hatvan - Lőrinci | 7. Dénesmajor |
| 3. Adács | 8. Mohács - Külső Béda |
| 4. Jászsági csatorna | 9. Pécs |
| 5. Gyomaendrőd | 10. Vaja |



- 10 magyarországi mintavételi helyről gyűjtöttünk mintákat, 404 egyed
- 6-114 egyedet vizsgáltunk mintavételi helyenként



MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK





MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK





MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

mintavételi helyek	n=	úszósugárszámok			foltozottság		oldalvonal	
		farokúszó	farok alatti úszó	hátúszó	igen (%)	nem (%)	szabályos (%)	nem szabályos (%)
Adács	56	19.3±0.9	19.7±0.8	7.0±0.0	21.4	78.6	17.9	82.1
Pilisvörösvár	13	19.4±0.7	18.5±0.8	7.1±0.3	0	100	92.3	7.7
Gyomaendrőd	8	18.8±0.9	18.4±1.1	7.0±0.0	0	100	0	100
Dénesmajor	114	19.7±1.1	18.0±1.0	7.0±0.0	0	100	0	100
Jászsági csatorna	6	19.5±0.8	19.5±0.8	7.0±0.0	100	0	0	100
Békéscsaba	11	19.5±0.5	18.5±0.8	7.0±0.0	0	100	0	100
Pécs-Dráva	52	20.8±1.3	19.5±0.7	7.0±0.0	5.8	94.2	0	100
Lőrinci-Hatvan	51	21.6±0.9	19.4±0.9	7.0±0.0	41.2	58.8	3.9	96.1
Vaja	63	20.5±0.8	19.6±1.5	7.0±0.0	0	100	20,63	79,37
Mohács-Külső Béda	30	20.9±1.2	19.6±1.1	7.0±0.0	33.3	66.7	0	100

Statisztikai módszer: egytényezős varianciaanalízist alkalmaztunk, (ANOVA) tukey teszttel.



KIVÉTELEK 2.

Szent István Egyetem, MKK-KTI
Halgazdálkodási Tanszék





KIVÉTELEK 3.



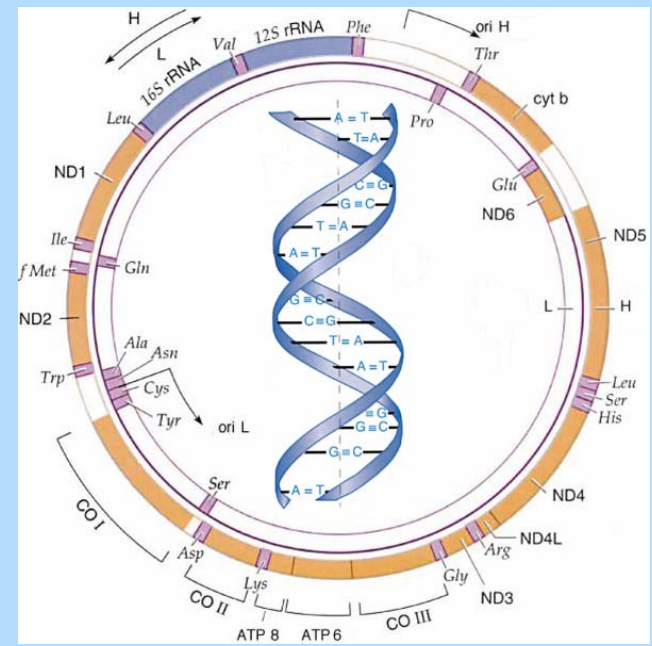
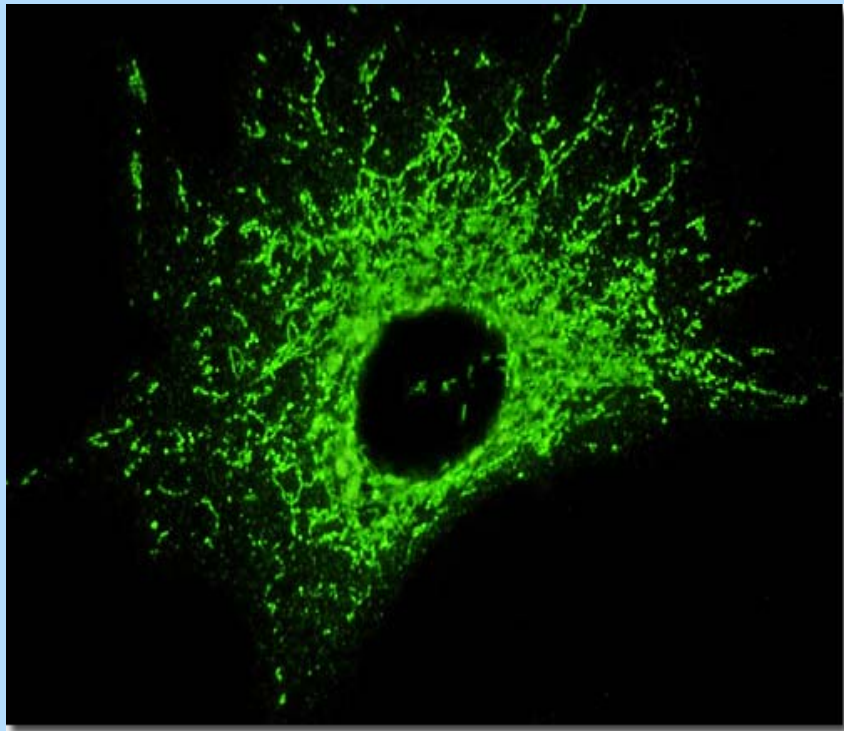
Szent István Egyetem, MKK-KTI
Halgazdálkodási Tanszék



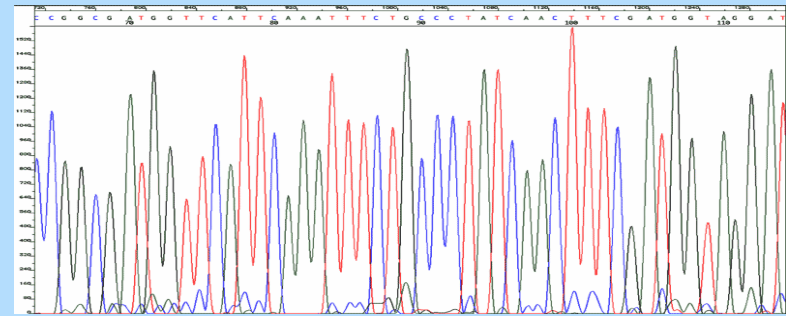


mtDNS VIZSGÁLATOK 1.

Összehasonlító szekvencia elemzéseket végeztünk, mind a hazai populációkból, mind az USA-ból származó minták mtDNS-én.



37 genes
Cytochrome oxidase I





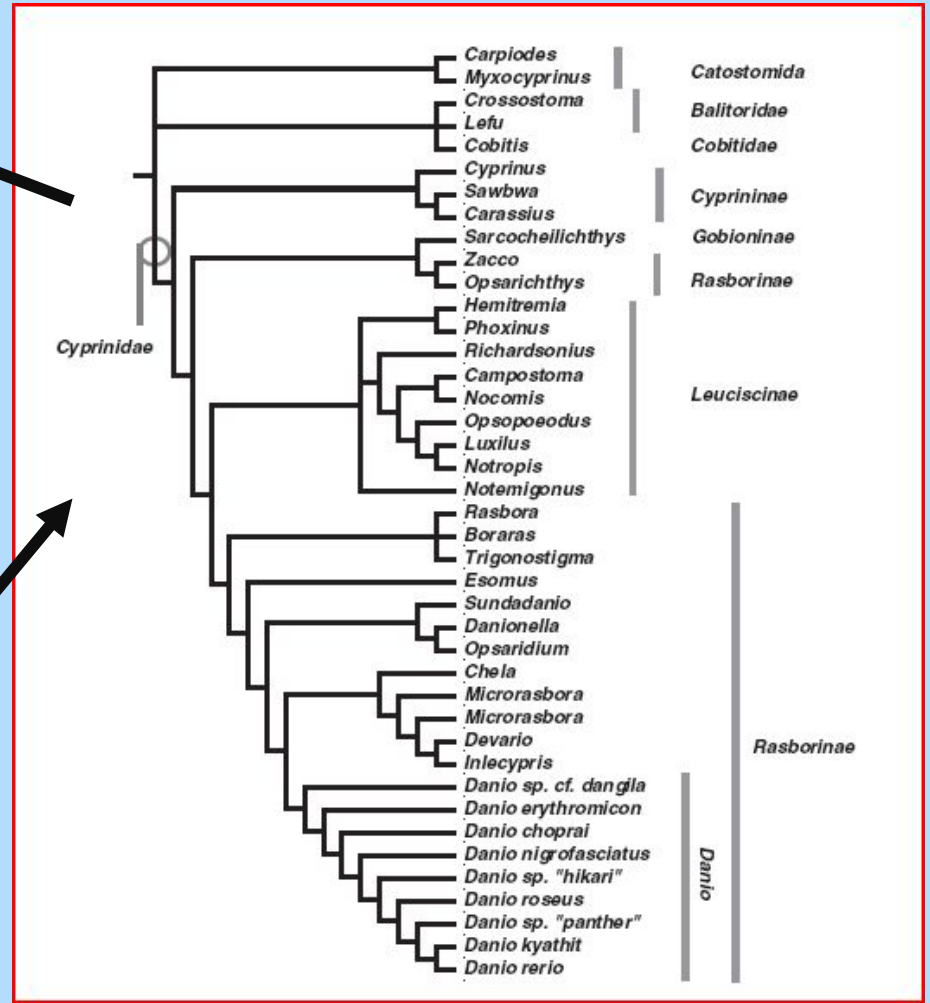
mtDNS VIZSGÁLATOK 2.

Szent István Egyetem, MKK-KTI
Halgazdálkodási Tanszék

Faj azonosítás



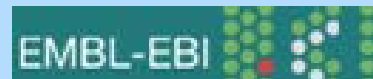
<http://www.fishbol.org/>





mtDNS VIZSGÁLATOK 3.

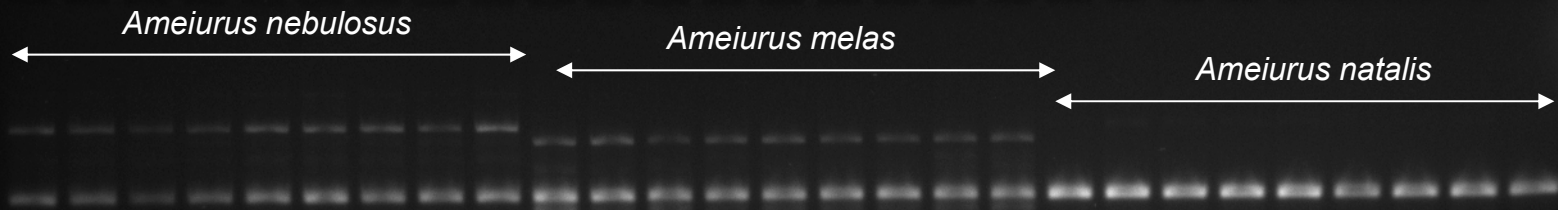
- Megszekvenáltuk az USA-ból származó 3 faj Co I és 16 S mitokondriális génjeit.
- Összehasonlítottuk a GénBank szekvencia adatbázisával.
- Megszekvenáltunk 10 magyarországi élőhelyről 67 egyed Co I mitokondriális génjét
- Összehasonlítottuk a az USA-ból származó 3 faj, valamint GénBank szekvencia adatbázisával
 - 59 db *Ameiurus melas*
 - 8 db *Ameiuris nebulosus*
 - 0 db *Ameiuris natalis*





GENOMIÁLIS DNS VIZSGÁLATOK 1.

- A hibridek azonosítására alkalmas teszt-rendszer kidolgozása.
- Az USA-ból származó 3 faj mintáinak összehasonlító vizsgálata (alacsony megbízhatóságú PCR reakciókkal dolgoztunk).

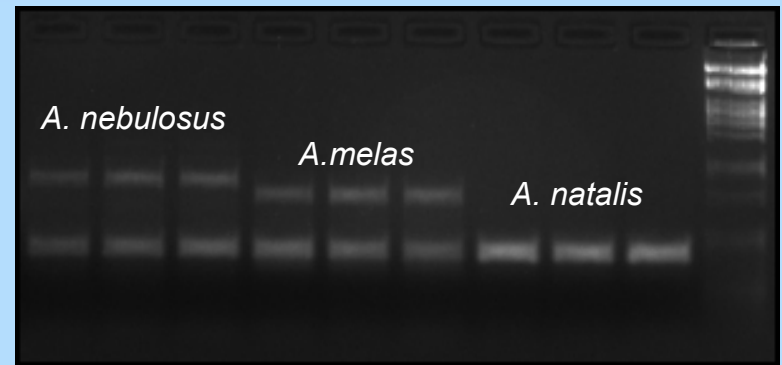


az amerikai mintákból származó PCR reakció eredménye

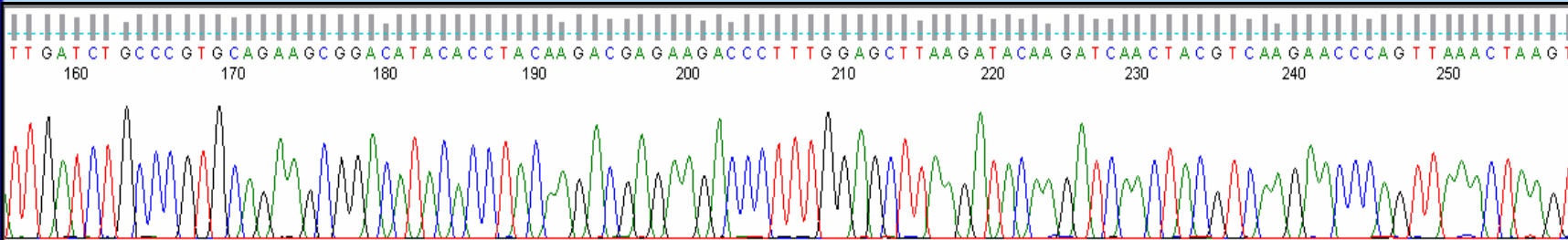


GENOMIÁLIS DNS VIZSGÁLATOK 2.

- A fragmentek szekvenciáit meghatároztuk.



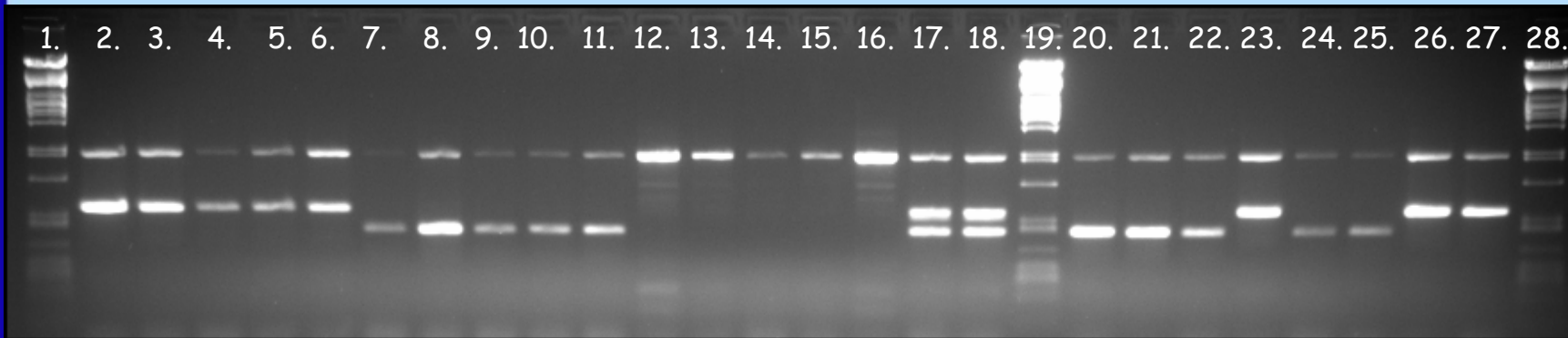
- A faj pecifikus fragmentek olyan új szekvenciát kódolnak, amelyek még nem szerepelnek a genetikai adatbázisokban.
- A két fajnál eltérő szekvenciát kaptunk.
- Nagy valószínűséggel nem kódoló szakaszok.





GENOMIÁLIS DNS VIZSGÁLATOK 3.

- Az azonosított fragmentekre alapozva egy olyan duplex PCR eljárást dolgoztunk ki, amelyben fajspecifikus genomi DNS szakaszokat és egy kontroll fragmentet sokszorozunk fel egyetlen reakcióban.
- A módszer gyorsan, jól ismételhetően és egyértelműen azonosítja a lehetséges fekete és barna törpeharcsa hibrideket .



Az eredeti élőhelyről származó és a magyarországi élőhelyekről gyűjtött minták alapján kidolgozott duplex PCR reakció eredménye: 2-6 minta: *A. nebulosus* (US); 7-11 minta: *A. melas* (US); 12-16 minta: *A. natalis* (US); 17-18 minta: kevert DNS; 20-22 minta: *A. nebulosus* (HU); 23. minta: *A. melas* (HU); 24-25. minta: *A. nebulosus* (HU); 26-27. minta: *A. melas* (HU); 1., 19., 28. minta: 100bp-os molekulásúly marker



GENOMIÁLIS DNS VIZSGÁLATOK 4.

- Az állomány szintű vizsgálat elkezdődött (10 élőhely 234 minta).
 - 10 élőhely közül 9 élőhelyen a fekete törpeharcsa jelenlétét igazoltuk.
 - 1 élőhelyen egymás mellett él a genetikailag is igazolt barna és fekete törpeharcsa.
 - Nem találtunk hibrid egyedeket.

Fajok	DNS n=	úszósugárszámok			foltozottság		oldalvonal	
		farok úszó	farok alatti úszó	hátúszó	igen (%)	nem (%)	szabályos (%)	nem szabályos (%)
<i>A. melas</i>	225	20,16 ± 1,31	18,94 ± 1,54	7,01 ± 0,09	2,67	97,33	100	0
<i>A. nebulosus</i>	9	19,75 ± 1,04	19,38 ± 0,92	7,00 ± 0,00	0	100	91,11	8,89

Statisztikai módszer: egytényezős varianciaanalízist alkalmaztunk, (ANOVA) tukey teszttel.



ÖSSZEFOGLALÁS

1. Sikerült találni olyan genetikai markert, melynek segítségével azonosíthatóvá válnak az *Ameiurus nebulosus*, *Ameiurus melas* és az *Ameiurus natalis* fajok.
2. Nem találtunk *A. natalis* eredetű egyedeket.
3. Kidolgoztunk egy kimutatási módszert, amely azonosítja az *A. nebulosus* X *A. melas* hibrideket.
4. Egy magyarországi élőhelyen találtunk PCR vizsgálatok alapján *A. nebulosus*-t.
5. Nem találtunk hibrid egyedeket.
6. Nem találtunk a fajok elkülönítésére alkalmas morfológiai bélyeget.





FOLYTATÁS

- Jövőben Magyarország teljes területét lefedni (további 6 - 8 élőhelyen mintagyűjtés).
- Európa országaiból szeretnénk mintákat gyűjteni és összehasonlító vizsgálatokat végezni.
- Természetes hibridizáció további genetikai vizsgálata.
- Mesterséges hibridizáció tesztelése.





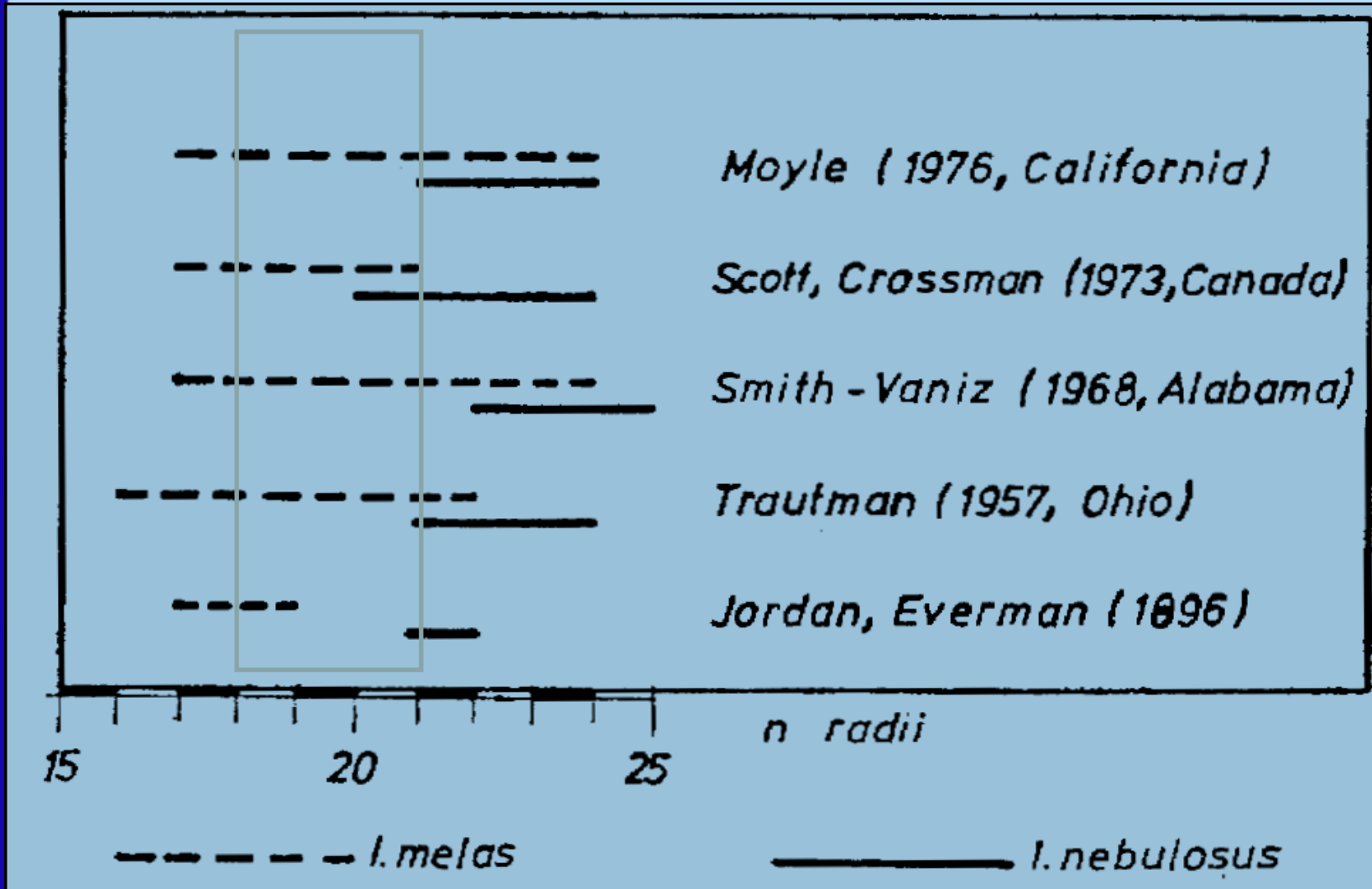
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

- Dr. prof. Hanping Wang-nak az amerikai minták beszerzésében nyújtott segítségét.
- Sallai Zoltánnak a magyarországi törpeharcsákkal kapcsolatos hasznos információit.
- Kánainé Sipos Dórának értékes tanácsait.



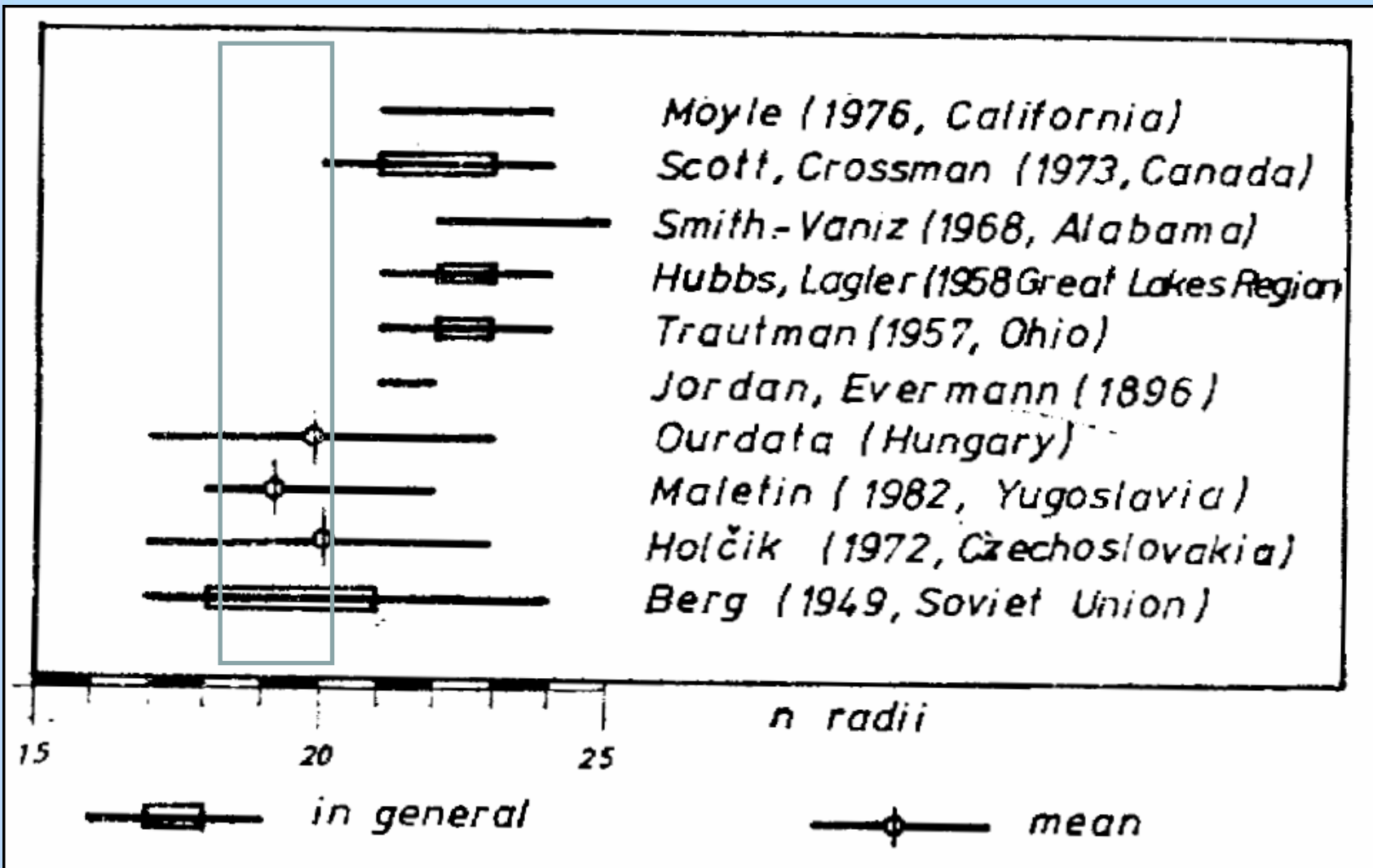


FAROK ALATTI ÚSZÓ





A. NEBULOSUS FAROK ALATTI ÚSZÓ





KIVÉTELEK 1.



- helyi színezetek-változatok közül néhány példa
- alapvetően nincs határozó morfológiai bélyeg néhány kivételtől eltekintve

