

Hal biotechnológia és genommanipuláció

Dr. Kovács Balázs



Molekuláris genetikai markerek a gyakorlatban

KÍNAI RAZBÓRA (PSEUDORAZBORA PARVA) POPULÁCIÓK GENETIKAI ANALÍZISE RAPD MÓDSZERREL



Bevezetés I.

Kínai razbóra (Pseudorasbora parva)

- Eredeti élőhelye K-Ázsia; Magyarországon 1963-ban észlelték először (Molnár, 1967)
- 1970-től szinte minden vizünkben megtalálható
- Jól tűri az oxigén hiányt és a vízszennyezést
- Gyors növekedésű
- Tavasztól-őszig folyamatosan ívó, ikragondozó halfaj



Bevezetés II.

- A Kínai razbóra az első számú „gyom-hal”
- Táplálék-konkurens, ikra pusztító
- Tenyésztett nagy értékű ragadozó halainknak táplálék-bázis
- Keveset tudunk a halfaj genetikai háttéréről



Célkitűzés

Hazai és külföldi populációk genetikai analízise RAPD
módszerrel

Anyag és Módszer I.

- Az analízishez szükséges mintákat 10 különböző élőhelyről gyűjtötték be, amit alkoholban tartósítottak
- A begyűjtött egyedek száma 3db – 24db között változott
- A laborba érkezést követően a mintákat -20°C-on tároltuk

1.	Magyarország; Isaszeg	24db
2.	Magyarország; Babat-völgy	24db
3.	Magyarország; Köröm	24db
4.	Magyarország; Nagyvenyim	24db
5.	Magyarország; Százhalombatta	12db
6.	Csehország; Podsendek	24db
7.	Kína; Nimbo	18db
8.	Lengyelország; Golysz	24db
9.	Szlovénia; Doluja Bistrica	3db
10.	Horvátország; Horka na Morave	24db

Anyag és Módszer II.

Alkalmazott technikák:

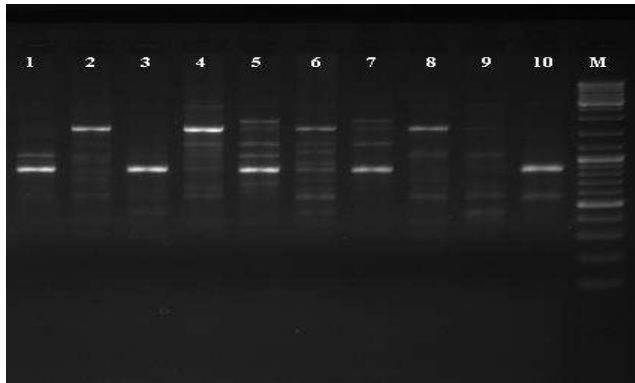
- DNS izolálás (DNS tisztítása fenol-kloroformos eljárással, valamint sós kicsapással)
- DNS koncentráció meghatározása Spektrofotométerrel
- Elő vizsgálatok; melyben 21 primert teszteltünk, ezek közül a következő kettőt választottuk ki az analízishez:

U 192: GCA AGT CACT; *Vila M8*: TCTGTTCCCC.

- RAPD analízis
- Agaróz gél elektroforézis
- Számítógépes feldolgozás Excel programban készített adatmátrixban
- Törzsfa készítése POPGEN (Yeh, 1999) szoftverrel

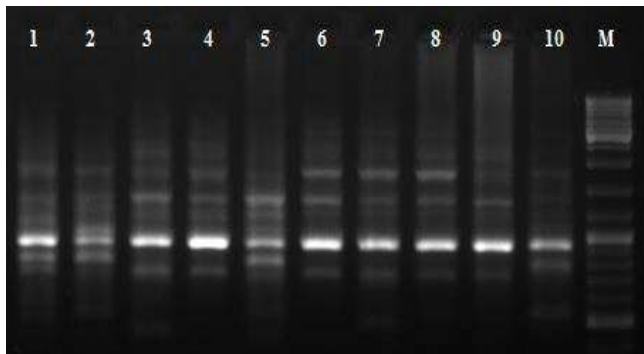
RAPD analízis

A kiértékelést vizuálisan molekulásúly marker (M) segítségével végeztük



← „Vila M8” primer esetében a vizsgált fragmentek: 4390bp; 3000bp; 1925bp; 1430bp; 850bp; 580bp

Az egyedek 1-től 10-ig számozva láthatók, az M jelzés 100bp-os molekula súly markert jelöl.



← „U192” primer esetében a vizsgált fragmentek: 1040bp; 960bp; 800bp; 700bp; 680bp; 550bp

Fragment mintázatból Genotípus

		Szlovénia		
		1	2	3
	Egyedek azonosítója:			
U	1040	1	1	1
	960	0	1	1
	800	1	0	0
	700	1	1	1
	680	1	1	1
	550	0	0	1
V	4390	0	0	0
	3000	1	1	1
	1925	0	0	0
	1430	1	1	1
	850	1	1	1
	8	580	0	1

A gél kiértékelés során az egyes fragmentumok hiányát 0-val, meglétét 1-sel jelöltük.

A kapott 2-es számrendszerű bináris kódot 10-es számrendszerűre váltottuk az alábbi képlet alapján:

$$1 \cdot 2^9 + 0 \cdot 2^8 + 1 \cdot 2^7 + 0 \cdot 2^6 + 0 \cdot 2^5 + 1 \cdot 2^4 + 1 \cdot 2^3 + 0 \cdot 2^2 + 1 \cdot 2^1 + 1 \cdot 2^0$$

1011100	110110	110111
10110	010111	010110
↓	↓	↓
2966	3479	3542

A vizsgált fragmentek előfordulási gyakorisága

Fragmentek előfordulási gyakorisága populációnként (%)													
	Fragment méret (bp)	CSEHORSZÁG	KÍNA	LENGYELORSZÁG	ISASZEG	BABAT-VÖLGY	KÖRÖM	SZLOVÉNIA	HORVÁTORSZÁG	NAGYVENYIM	SZÁZHALOMBATTA	Hány egyedben található meg összesen	Összesített előfordulási gyakoriság (%)
U	1040	0	50	25	46	25	8	100	0	38	50	52	26
1	960	100	94	100	100	79	100	67	100	83	75	187	93
9	800	0	28	33	29	29	17	33	13	50	58	54	27
2	700	0	39	29	33	4	29	100	8	33	42	48	24
	680	54	33	8	13	4	4	100	0	21	25	37	18
	550	8	0	4	17	21	8	33	4	13	33	23	11
V	4390	88	0	33	33	21	42	0	25	25	0	64	32
i	3000	88	94	83	83	75	100	100	100	92	92	180	90
l	1925	4	72	50	33	79	29	0	83	63	58	102	51
a	1430	67	28	33	38	25	13	100	92	29	42	84	42
M	850	21	83	46	83	88	67	100	79	54	42	128	64
8	580	8	50	21	17	29	4	33	13	8	8	35	17

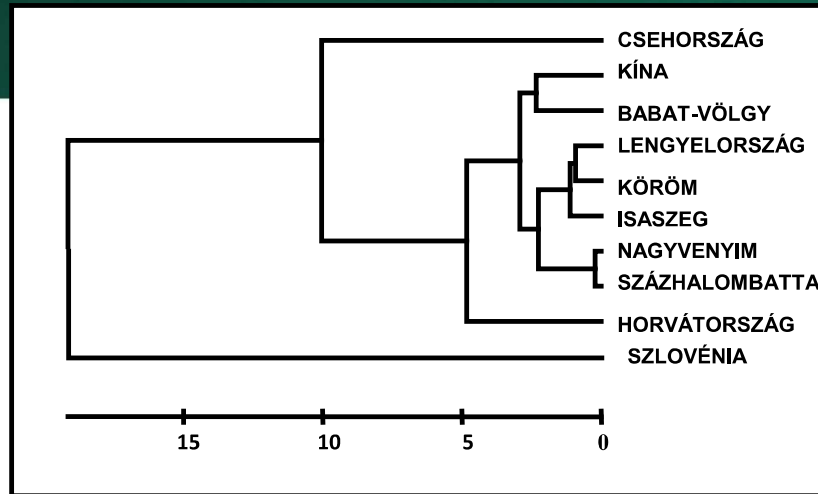
- Nincs kifejezetten populációra jellemző fragment, illetve van olyan ami nem minden populációban van jelen
- A vizsgált fragmentek előfordulási gyakorisága 11% - 93% között változott

Populációk diverzitásának összehasonlítása

Genotípusok	Genotípusok száma populációnként										
	CSEHORSZÁG	KÍNA	LENGYELORSZÁG	ISASZEG	BABAT-VÖLGY	KÖRÖM	SZLOVÉNIA	HORVÁTORSZÁG	NAGYVENYIM	SZÁZHALOMBATTA	Összes genotípus
U192 + VILA M8 Genotípus (db):	10	17	21	23	19	19	3	13	23	12	120
U192 Genotípus (db):	3	12	8	10	12	7	3	4	14	12	31
VILA M8 Genotípus (db):	7	9	16	15	14	10	2	10	13	5	36
egyedszám	24	18	24	24	24	24	3	24	24	12	

- 201 egyedet vizsgáltunk és összesen 120 féle genotípust kaptunk a két primerrel
- A primerek külön választva 31-36 féle genotípust mutattak

A populációk egymáshoz viszonyított genetikai távolsága



A létra Nei (1972)-féle genetikai távolságot mutatja

A genetikai távolságot / hasonlóságot Nei 1972-es cikke alapján számítottuk ki:

$$GS_{Nei} = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j}$$

N_{ij} : a mindkét típus (populáció) mintázatában megtalálható fragmentumok száma.

$N_i + N_j$: pedig az egyes típusokban megtalálható fragmentumok számának összege.

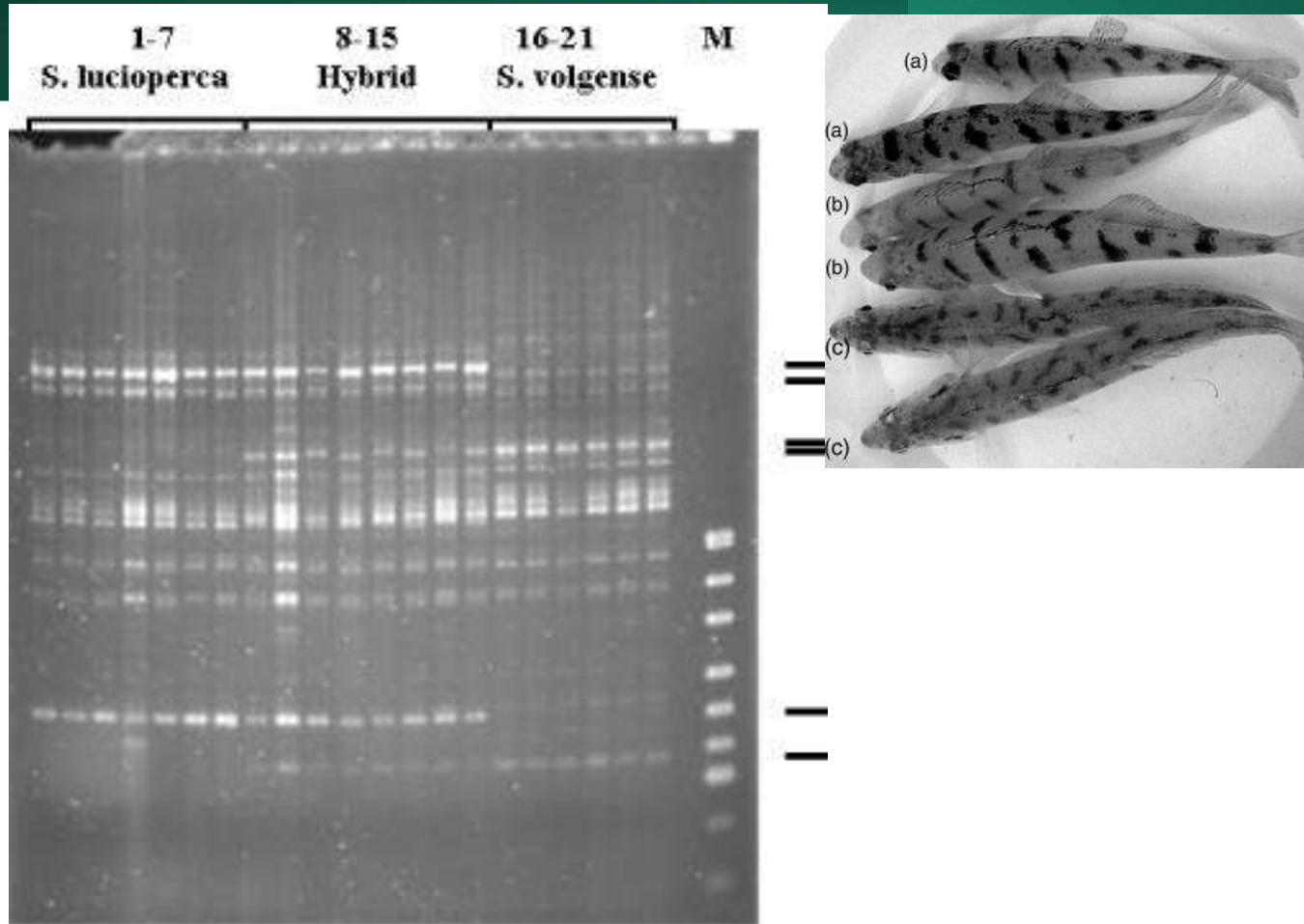
Értékelés

- 120 különböző genotípust kaptunk, amelyek közül 79 csak egyszer fordult elő.
- A legnagyobb relatív változatosságot a százhalombattai populáció mutatta, ahol 12 egyed 12 különböző genotípusát találtuk.
- Legkevésbé változatosnak a csehországi populáció bizonyult, mivel ott 24 egyednek „csak” 10 féle genotípusát sikerült kimutatni.
- Nem sikerült a populációk földrajzi elhelyezkedése és a genetikai hasonlósága közötti összefüggést bizonyítani.

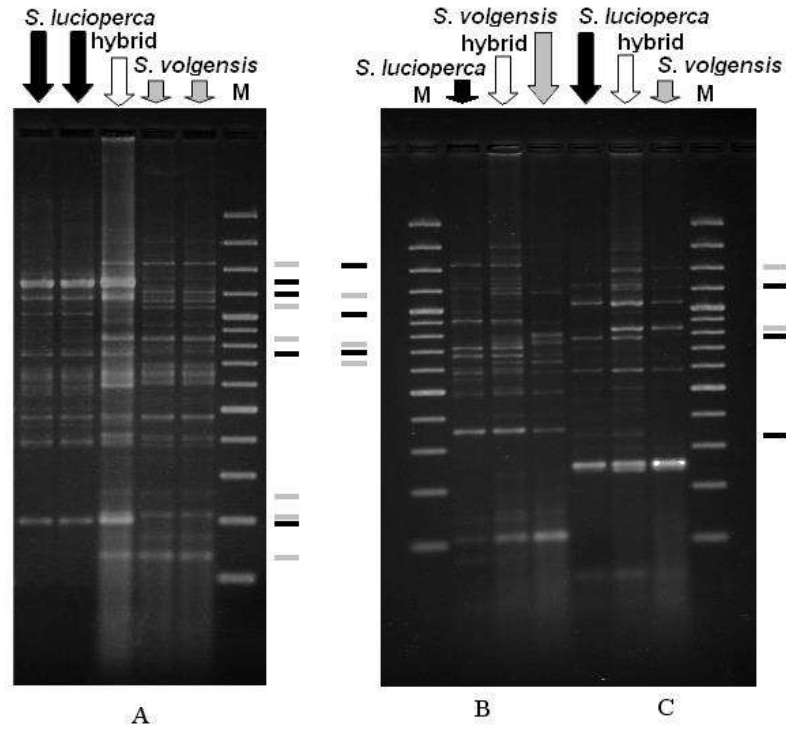
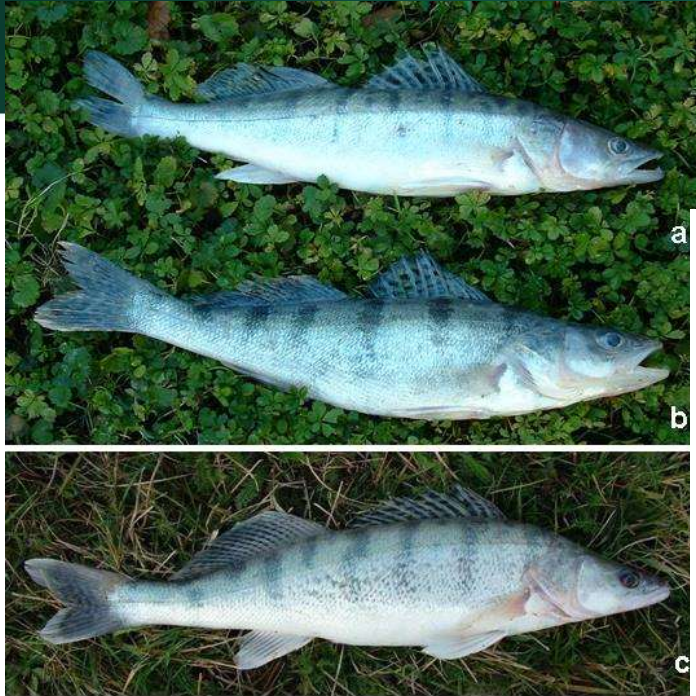
Javaslat

- Több primer használatával több polimorf fragment vizsgálatára lenne lehetőség;
- Pontosabb eredmények elérése érdekében, célszerű lenne több élőhelyet bevonni a kísérletbe magasabb egyedszámmal;
- Érdeemes lenne a kapott eredményeket más gazdaságilag fontosabb intenzíven tenyésztett, illetve halászott halfajok genetikai gazdagságával összevetni.

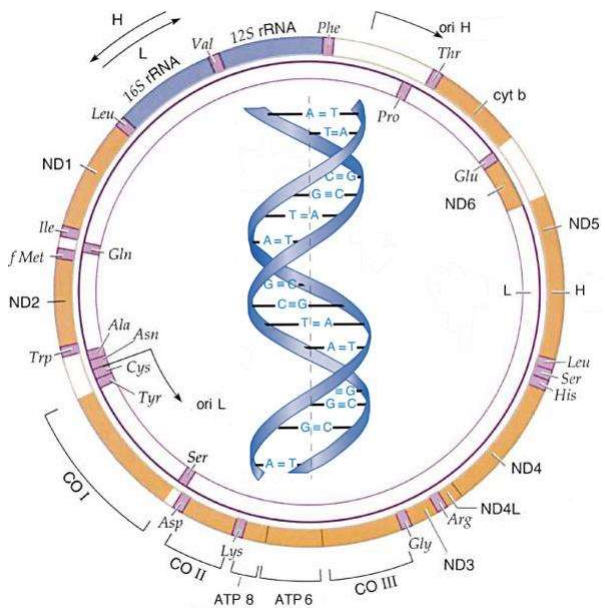
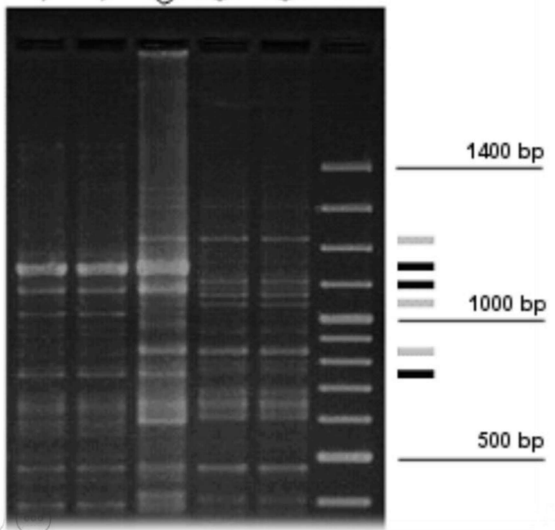
Süllő hibrid Sander lucioperca X S. volgense



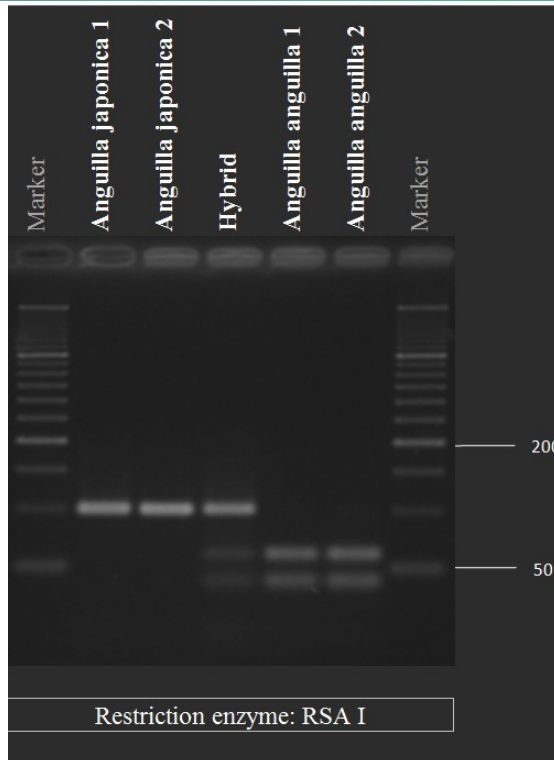
Természetes hibrid



Pike-perch X Volga sander hybrid



Anguils *angula* X *A. Japonica* hibrid azonosítás PCR RFLP



Japán, európai és hibrid angolnák PCR-RFLP elemzése.

Gél elektroforézis (3%-os agaróz gél).

Amplifikált PCR termékek

FSH Angolna F és FSH Angolna R

használatával az emésztés előtti fragmentek (balra) és a restrikciós enzim segítségével

nyert fragmensek RsaI (jobbra)

50 bp-os molekulatömeg marker

(Fermentas, EU).

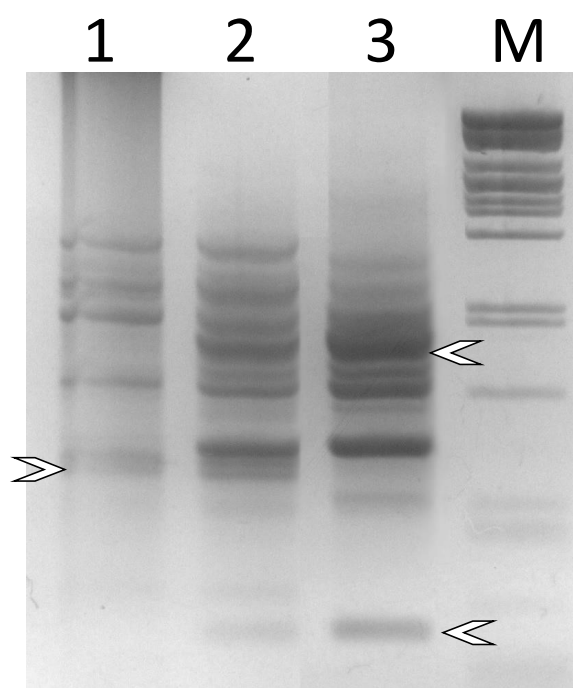
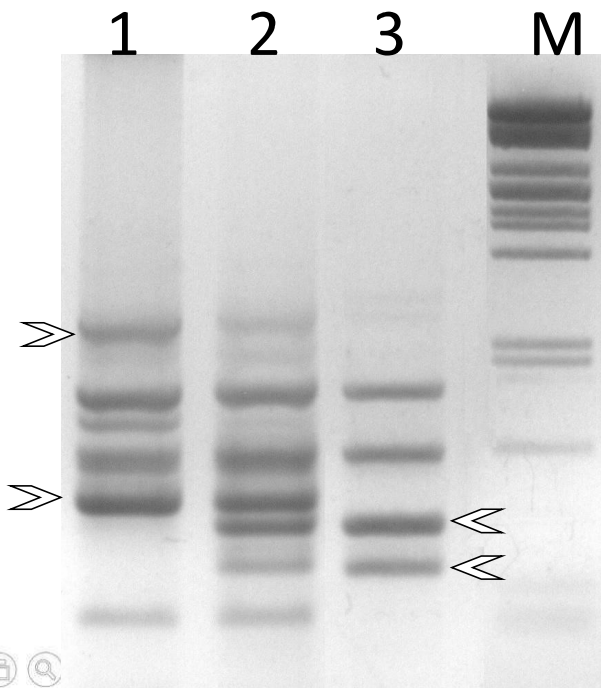
A. anguilla
CAACAGGCCTGCAACTTCAGGGATGTAGTCTATGAGACTGTACACTTGCCTGGGTGTCCCAGTGAATGGACCTCCACTTCACCTACCCTGTGGCTCTGAG

A. japonica
CAACAGGCCTGCAACTTCAGGGATGTAGTCTATGAGACTGTGCCTTGCCTGGGTGTCCCAGTGAATGGACCTCCACTTCACCTACCCTGTGGCTCTGAG

A. japonica × *A. anguilla*
CAACAGGCCTGCAACTTCAGGGATGTAGTCTATGAGACTGTGCCTTGCCTGGGTGTCCCAGTGAATGGACCTCCACTTCACCTACCCTGTGGCTCTGAG

Rsa I

Sterlet X Atlantic sturgeon hybrid by RAPD

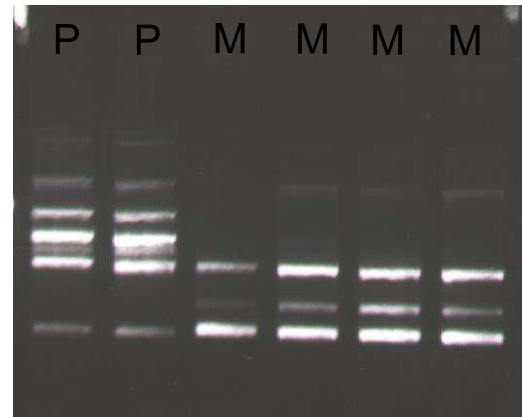
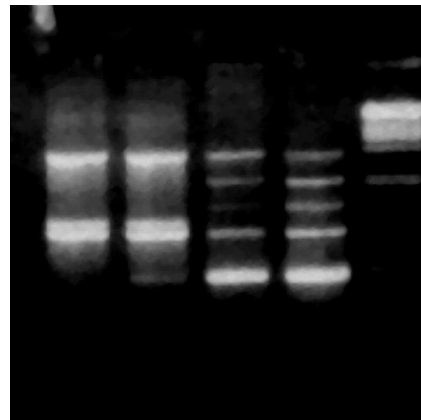
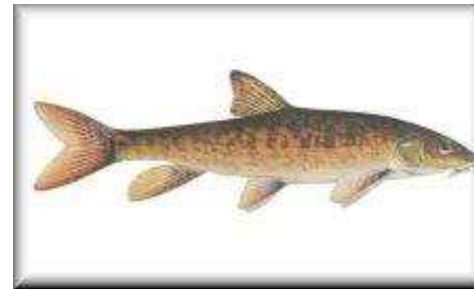


Separation of species by RAPD

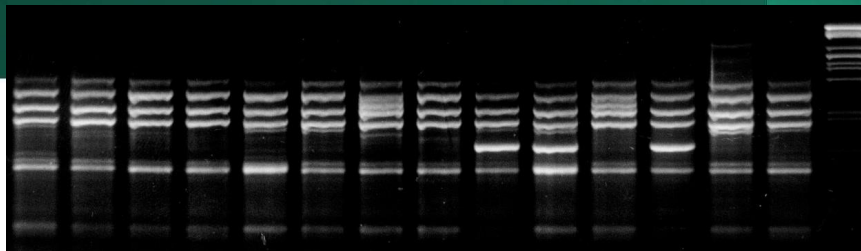
Barbus barbus (M)



Barbus meridionalis Petenyii
(P)



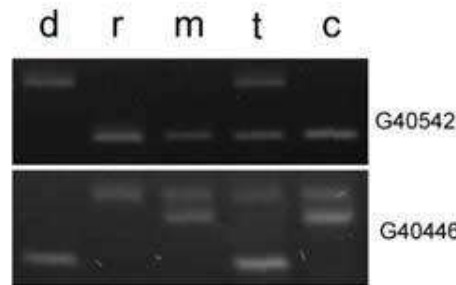
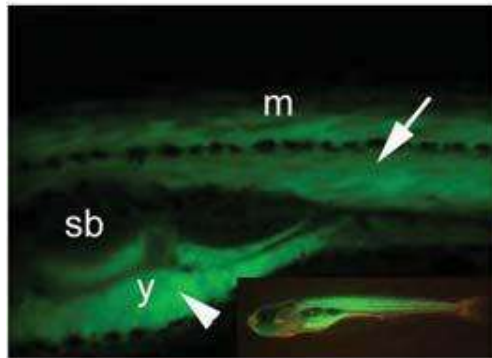
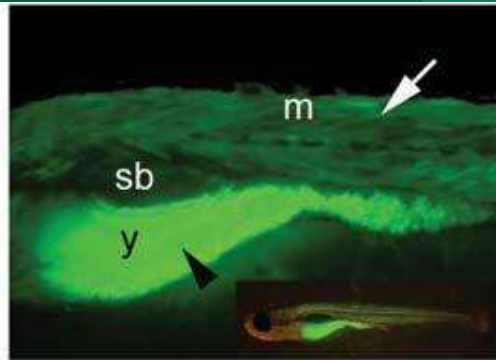
Genetics analyses of common carp broodstocks by RAPD



Függelék II. Táblázat: Az egyes primerekkel kapott bináris kódok százalékos megoszlása a dinnyési és tatai-D állományokban

BN	Dinnyési		Tatai-D		BN	Dinnyési		Tatai-D		BN	Dinnyési		Tatai-D	
	Egyed szám	%	Egyed szám	%		Egyed szám	%	Egyed szám	%		Egyed szám	%	Egyed szám	%
9	25	12.8%	0	0.0%	6	2	1.0%	1	2.8%	44	120	61.2%	13	36.1%
11	48	24.5%	14	38.9%	14	23	11.7%	6	16.7%	45	48	24.5%	14	38.9%
15	22	11.2%	0	0.0%	15	16	8.2%	5	13.9%	46	5	2.6%	4	11.1%
25	20	10.2%	0	0.0%	22	12	6.1%	3	8.3%	47	3	1.5%	2	5.6%
27	37	18.9%	16	44.4%	23	10	5.1%	2	5.6%	60	11	5.6%	0	0.0%
31	18	9.2%	1	2.8%	30	91	46.4%	8	22.2%	61	5	2.6%	3	8.3%
41	4	2.0%	0	0.0%	31	42	21.4%	11	30.6%	62	3	1.5%	0	0.0%
43	10	5.1%	2	5.6%						63	1	0.5%	0	0.0%
47	4	2.0%	1	2.8%										
59	5	2.6%	2	5.6%										
63	3	1.5%	0	0.0%										

Zebradánió oocita transzplantáció



D: donor female;
R: recipient female;
M: male;
T:transplanted *stepbrother* ;
C: controll *stepbrother*

In vivo, Acridine-Orange festésen alapuló toxikológia teszt rendszer optimalizálása zebradánió (*Danio rerio*) halfajra

- **Környezeti toxikológiai módszer fejlesztés**
- **Programozott sejthalál (apoptózis/nekrózis)**
- **Acridine Orange festésen alapuló in vivo eljárás**
- **etanol**
- **vörösiszap pora**
- **Cél: sejtszámlálás alkalmazása**
- **automatizálása**

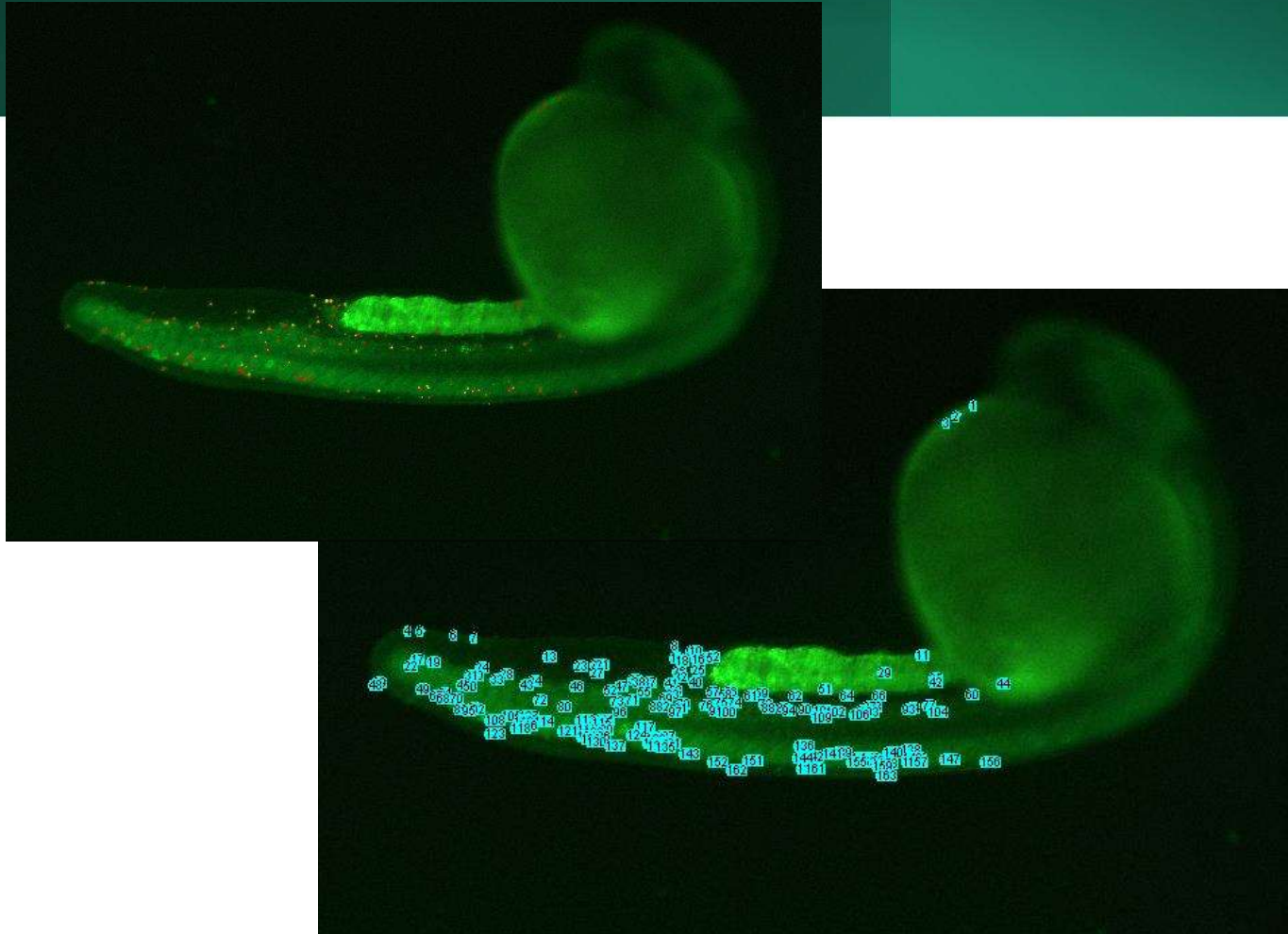
Az apoptózis

- **Morfológiai, funkcionális illetve fejlődéstani esemény**
- **Toxikus anyagok hatására is végbemegy**
- **Környezet szennyezettségi fokának vizsgálata**
- **Zebradánió (Danio rerio) embriók**
- **Acridine Orange fluoreszcens festés**

Anyag és módszer

- **Katasztrófa helyszínéről származó vörösiszap koncentrátum**
- **AB vonalú zebradánió embriók (10-20 embrió-mérés/csoport)**
- **E3 mediumban**
- **1x (= 10 µg/ml) Acridine Orange törzsoldat**
- **Pronáz E enzimmel való kezelés**
- **Standardizálás**

ImageJ Colony counter plugin használata



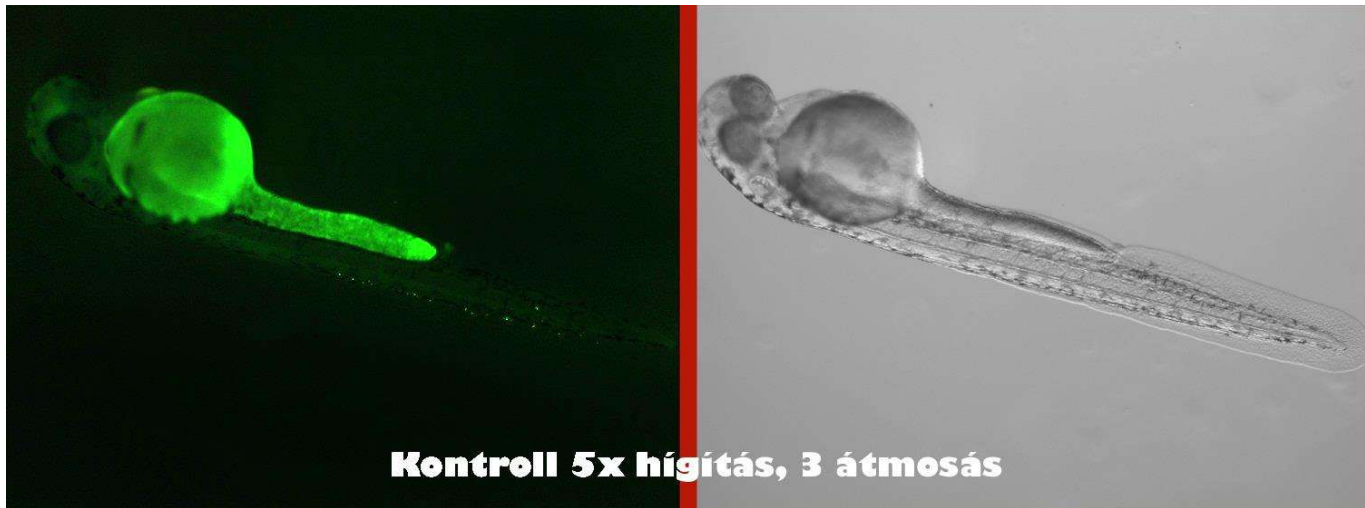
Festés koncentráció

- 2x, 5x, 8x, 10x, 15x hígításokat készítettünk
- 5x-es (2 μ g/ml) bizonyult a legjobbnak

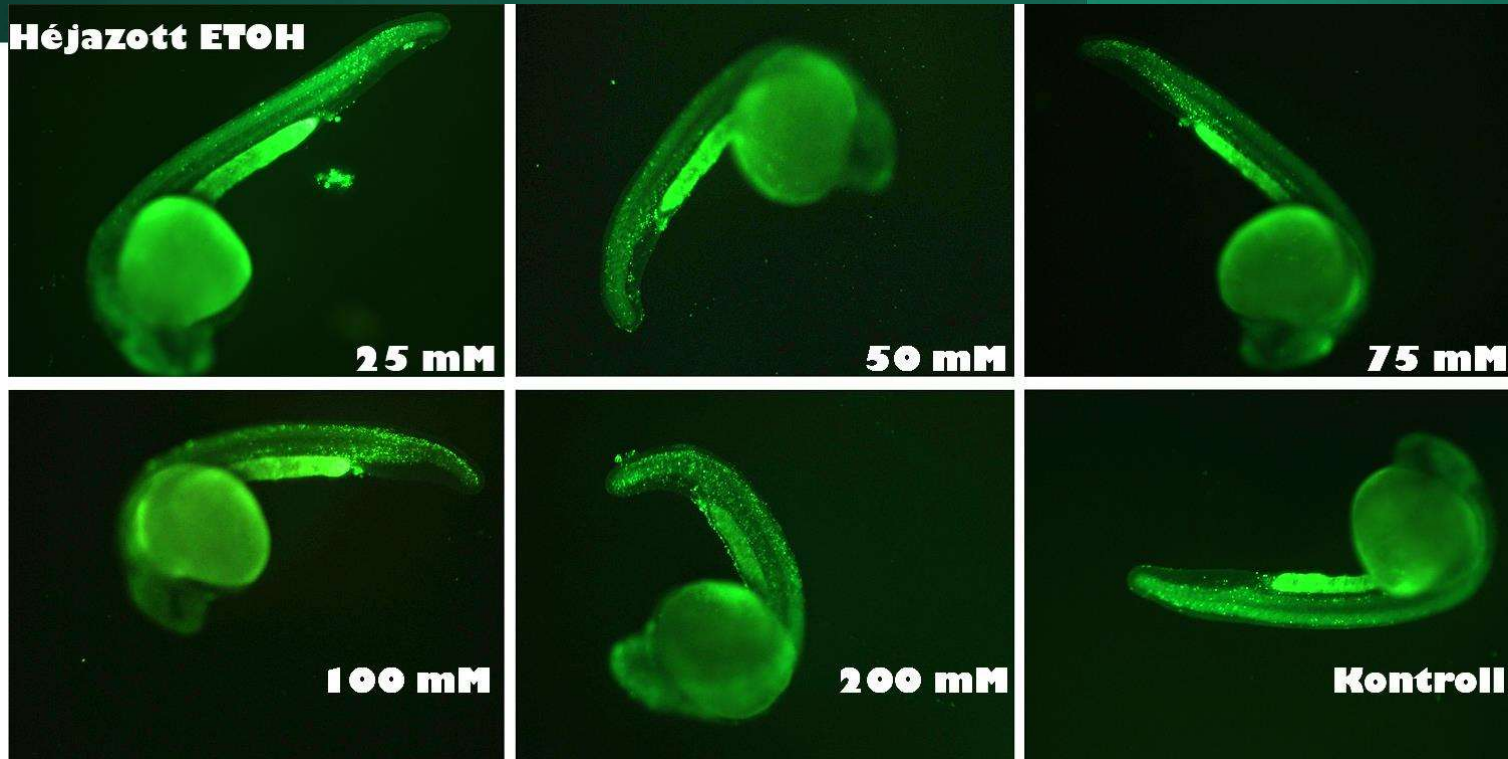


Mosások száma

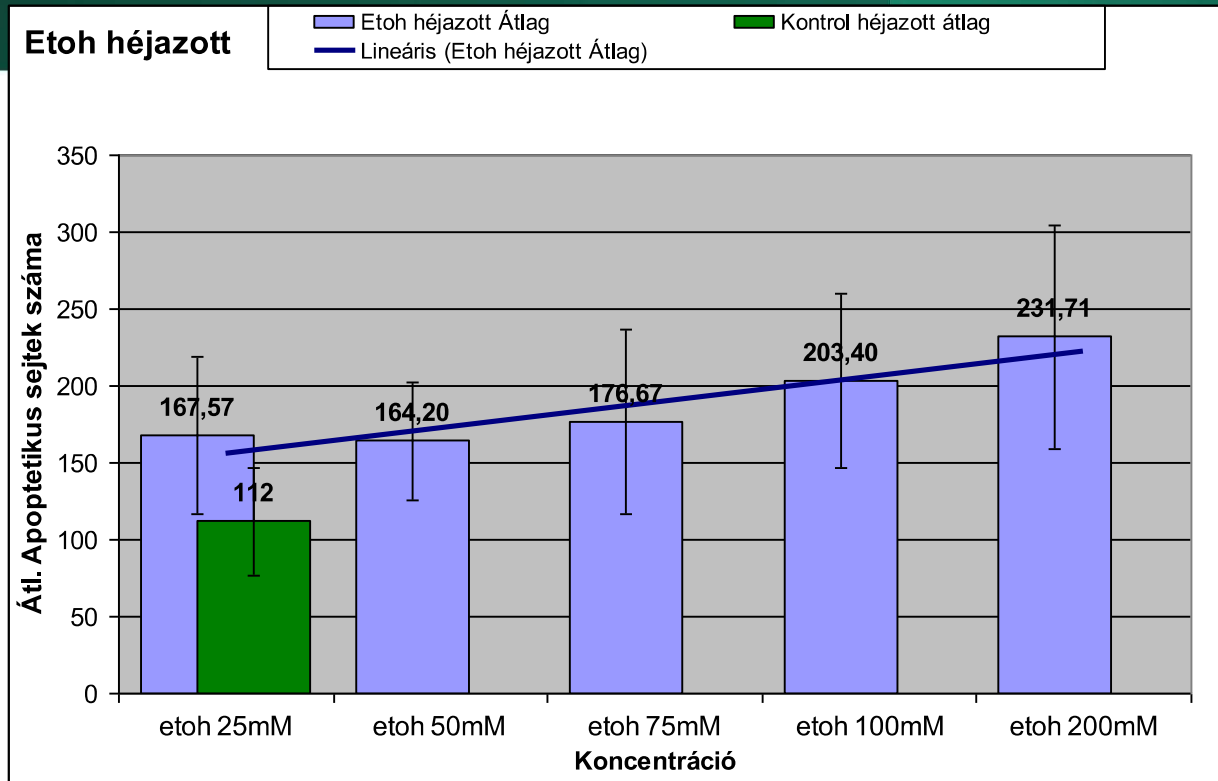
- 20 perc festési idő
- 3, 4, 5, 6, illetve 7 alkalommal mostuk át az embriókat E3 mediummal.
- 3-szori átmosás elegendő



Festési eljárás tesztelése etanollal



Héjazott zebradánió embriók különböző koncentrációjú etanol oldatban



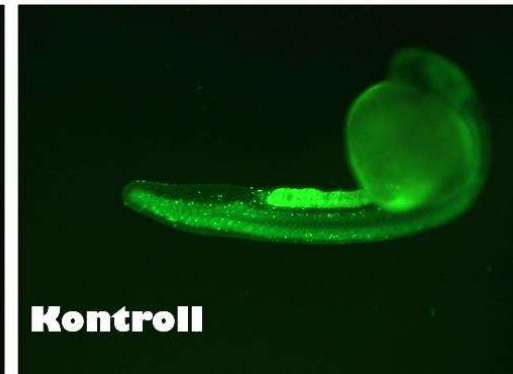
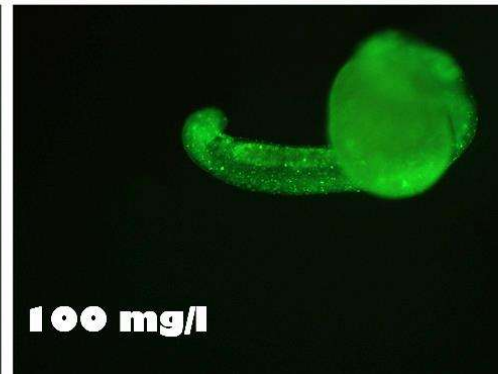
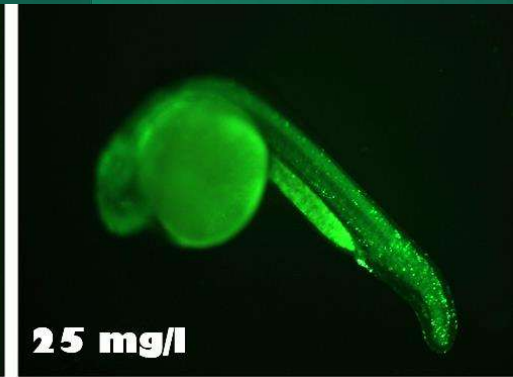
alacsony koncentrációjú toxikus hatások vizsgálatára alkalmas a teszt.

Vörösiszap porának apoptotikus hatásának vizsgálata

- **6,25 mg/l; 12,5 mg/l; 25 mg/l; 50 mg/l; 100 mg/l**
- **Ikrahéjjal rendelkező (20-20 embrió/csoport)**
- **Ikrahéjjal nem rendelkező (10-10 embrió/csoport)**

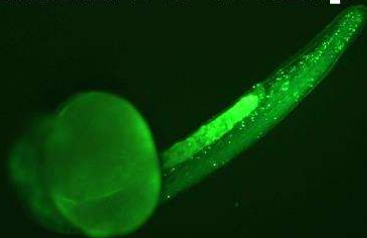
Vörösizappal kezelt héjazott zebradánió embriók

Héjazott Vörösizap

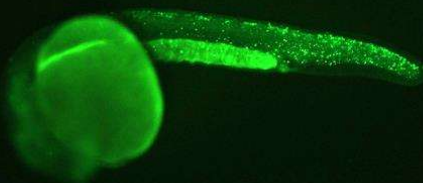


Vörösiszappal kezelt héjazatlan zebradánió embriók

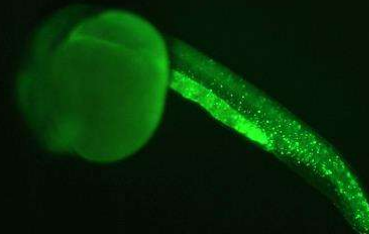
Héjazatlan Vörösiszap



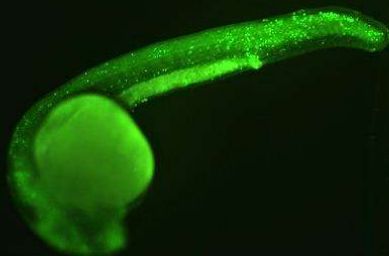
6,26 mg/l



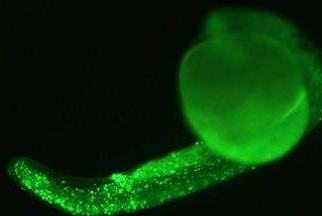
12,5 mg/l



25 mg/l



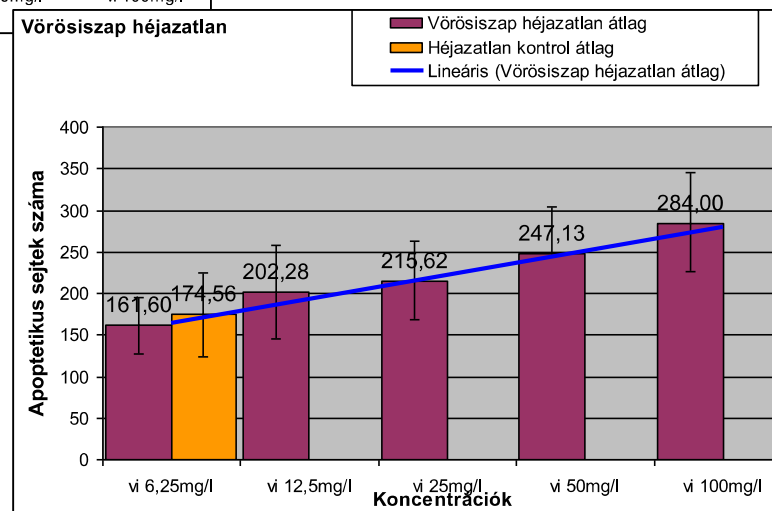
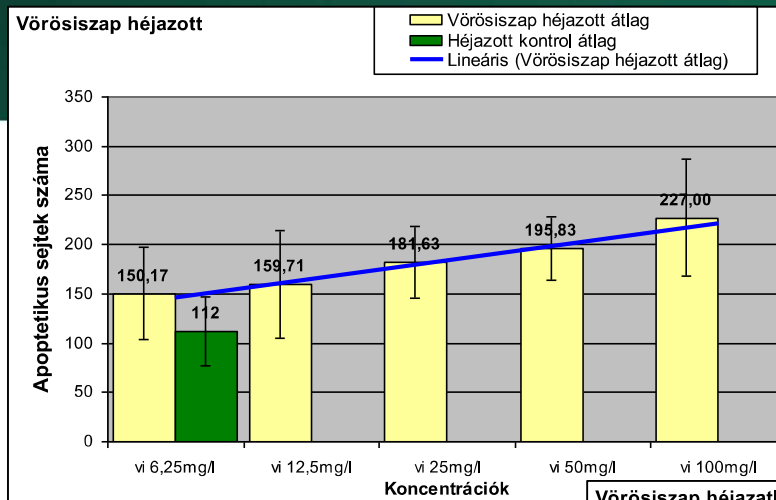
50 mg/l



100 mg/l

Kontroll

Vörösiszappal kezelt héjazott és héjazatlan zebraadánió embriók diagramja



Összefoglalás

- **Összességében sikerrel adaptáltunk és optimalizáltunk egy apoptotikus sejtek Acridine Orange festésén alapuló, toxikológiai módszert.**
- **Teszt kivitelezésének további optimalizálása**
- **Más fejlődési stádiumú zebradánió embriók alkalmasabbak-e a teszt kivitelezésére?**
- **Kikelt lárvákon való tesztelés**
- **Egyszerűsíthető-e a módszer?**
- **A vörösiszap por koncentráció függően növelte az apoptotikus sejtek számát → további toxikológiai vizsgálatok javasoltak**

**HAZAI SEBESPISZTRÁNG-
ÁLLOMÁNYOK GENETIKAI
HÁTTÉRÉNEK FELMÉRÉSE ÉS
EGY GENETIKAI MARKEREKRE
ALAPOZOTT TENYÉSZTÉSI
RENDSZER KIALAKÍTÁSA**



BEVEZETŐ

SEBES PISZTRÁNG (*SALMO TRUTTA M. FARIO*)



Édesvízi életmódra áttért pisztráng

Európában őshonos, de betelepítették Amerikába, Indiába, Japánba, Ausztráliába, Új-Zélandra



Hazai elterjedése

Elsősorban hegyvidéki patakjaink, Északi-középhegység, Dunántúli-középhegység és az Alpokalja vizei (pisztráng szintáj)



Értékes húsminőség, de főleg horgászati célú hasznosítás

19. századig a fő tenyésztett pisztrángfaj Európában
Hazai tenyésztés: Lillafüred, Szilvásvár



BEVEZETŐ

LAZACFÉLÉK GENETIKAI DIVERZITÁSA



Salmonide genom

Negyedik teljes genom duplikáció (tetraploid ős)
Rediploidizáció, $2n = 52 - 102$



Sebes pisztráng genom

Teljes mitokondriális genom, kapcsoltsági
térképek, transzkriptom, shotgun szekvenálás
(*Salmo trutta*)
 $2n = 80$



**Nagy genetikai diverzitás a fajon belül,
jó alkalmazkodóképesség és nagy
morfológiai differenciáltság jellemző**



Salmo trutta; Lake Chiemsee, Germany; lacustrine form, ~450 mm SL. A. Hartl



Salmo trutta; lower Rhine, Germany; ~80 mm SL.



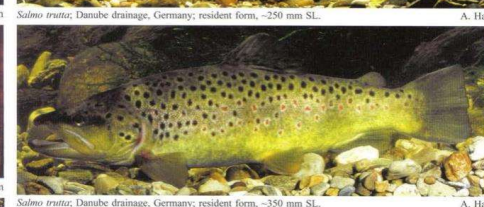
Salmo trutta; lower Rhine, Germany; marine form, smolt, ~250 mm SL. I. Steinmann



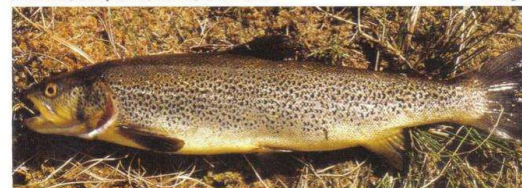
Salmo trutta; Danube drainage, Germany; resident form, ~250 mm SL. A. Hartl



Salmo trutta; Orkney Islands, Scotland; resident form. A. Ferguson



Salmo trutta; Danube drainage, Germany; resident form, ~350 mm SL. A. Hartl



Salmo trutta; Loch Crocach, Scotland; resident form. A. Ferguson



Salmo trutta; Danube drainage, Germany; resident form, ~500 mm SL. A. Hartl



Salmo trutta; Danube drainage, Germany; resident ecotype, nuptial male in front, ~300 mm SL. A. Hartl



Salmo marmoratus; Soca, Slovenia; 203 mm SL. B. Delling

BEVEZETŐ

SEBES PISZTRÁNG EVOLUCIÓS VONALAI

» Öt evolúciós vonal (mtDNS)

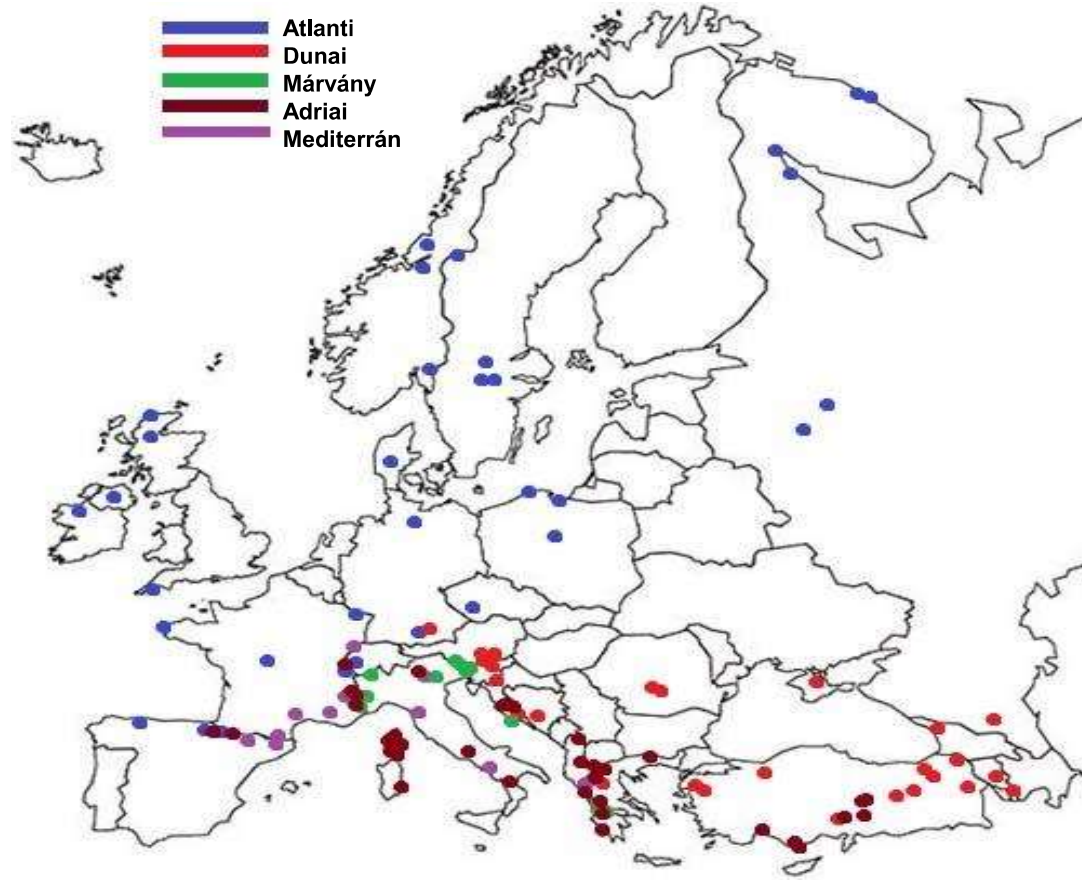
Bernatchez (2001), 166 populáció, 1791 minta alapján: atlanti, dunai, mediterrán, adriai és márvány.

» Populációk genetikai háttere a különböző hidrogeográfiai területekhez kapcsolódik

Utolsó jégkorszakot követő kolonizációs folyamatok vagy a populációk földrajzi és reprodukív elszigeteltsége révén.

» Hazai állományokról kevés információ

Dunai vízgyűjtő = dunai egyedek?



BEVEZETŐ SEBES PISZTRÁNG EVOLUCIÓS VONALAK KEVEREDÉSE



Számos területen kimutatták a vonalak hibridizációját

Antropogén és természetes eredetű hibridizáció



Az antropogén folyamatok visszaszorítása és a helyi populációk védelme egyre fontosabbá vált

Genetikai menedékek létrehozása
Közvetlen áthelyezés
Genetikailag tesztelt egyedek telepítése



Hazai állományok esetén is valószínű a keveredés

Atlanti tenyészetből és hazai vízfolyásokból származó egyedek utódaival történtek telepítések



The Danube Trout in Alpine Rivers



European Anglers Alliance
Rue du Luxembourg 47
1050 Brussels
Belgium
Tel: +32 (0)2 286 5956
Fax: +32 (0)2 732 5958
E-mail : email@eaa-europe.eu
Web: www.eaa-europe.eu

- » **A hazai sebespisztráng-állományok evolúciós vonalainak vizsgálata, az egyedek genetikai hátterének feltárása**
- » **A sebespisztráng-állományok populációgenetikai felmérése különböző genetikai markerekkel**
- » **Markerekre alapozott egyedi azonosító és tenyésztési rendszer kialakítása Lillafüreden a dunai génhányad növelésére**

BEVEZETŐ

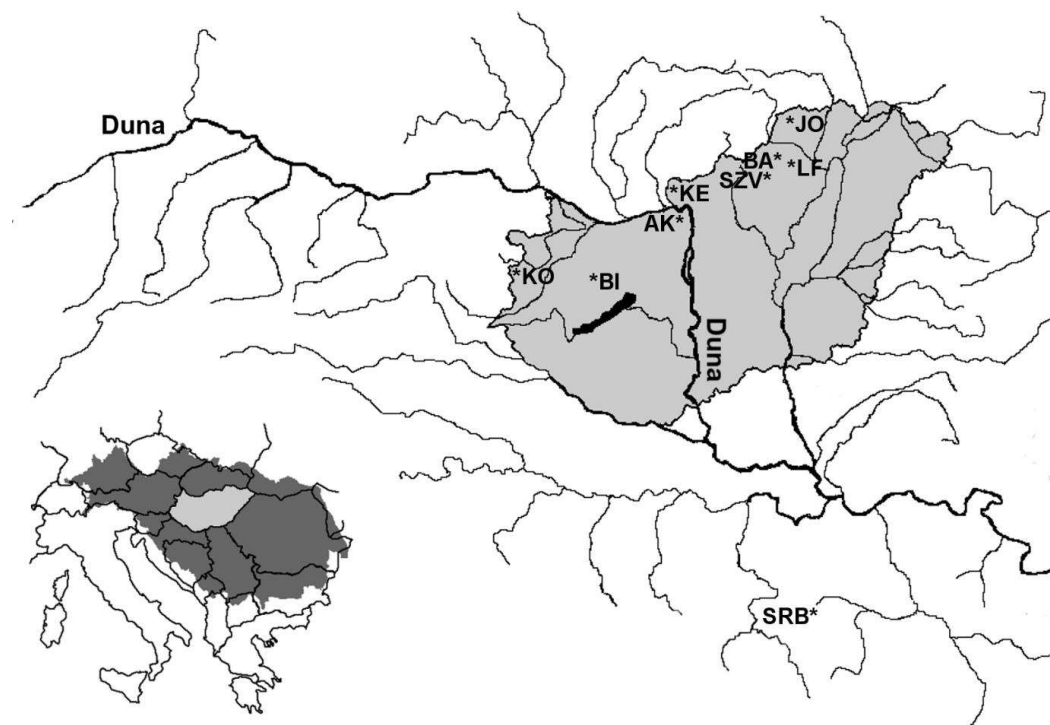
GENETIKAI MARKEREK

Marker	Jellege	A DNS előzetes ismerete szükséges	Öröklődése	Egy vagy több lókuszt egyidejű vizsgálatára alkalmas	Várható allélszám	Polimorfitás mértéke	Főbb alkalmazási területe
Alloenzim	biokémiai	Igen	kodomináns	Egy lókuszt	2-6	alacsony	Kapcsoltsági térképezés, Populációk vizsgálata
mtDNS	mitokondriális	Igen	anyai	Egy lókuszt	sok	változó	Anyai vérvonal vizsgálata
PCR-RFLP	sejtmagi	Igen	kodomináns	Egy lókuszt	2	alacsony	Kapcsoltsági térképezés
RAPD	sejtmagi	Nem	domináns/ recesszív	Több lókuszt	2	közepes	Populációk ujjlenyomat vizsgálata, Hibridek azonosítása
AFLP	sejtmagi	Nem	domináns/ recesszív	Több lókuszt	2	magas	Kapcsoltsági térképezés, Populációk vizsgálata
Mikroszatellit	sejtmagi	Igen	kodomináns	Egy lókuszt	sok	magas	Kapcsoltsági térképezés, Populációk vizsgálata, Leszármazási vizsgálatok
SNP	sejtmagi	Igen	kodomináns	Egy lókuszt	2 (de legfeljebb 4)	alacsony	Kapcsoltsági térképezés, Populációk vizsgálata

ANYAG ÉS MÓDSZER

HELYSZÍNEK

Populáció	Jelölés	Típus	N	N _{szelek}	Mintázás éve
Lillafüred 1.	LF1	Tenyész-állomány	401	41	2011
Lillafüred 2.	LF2	Tenyész-állomány	243	26	2013
Szilvásvár	SZV	Tenyész-állomány	75	27	2014
Bán	BA	Vad	25	12	2012
Jósva	JO	Vad	33	16	2012
Kemence	KE	Vad	24	20	2012
Apátkúti	AK	Vad	50	28	2013
Kölöntés	KO	Vad	14	14	2013
Bíttva	BI	Vad	9	9	2014
Panjica (Serbia)	SRB	Vad	14	12	2014
Összes (db)	10		888	205	



ANYAG ÉS MÓDSZER

ALKALMAZOTT GENETIKAI MARKEREK

Sebes pisztráng
vizsgálataiban széleskörűen
használt markerek
■ ismert allélméreték

Lazacfélékben konzervált
ivari marker

Marker	Típus	Enzim/ Festék	Dunai allélméret (bp)	Atlanti allélméret (bp)	Egyéb allélméret (bp)	Referencia
CR mtDNS	Mitokondriális PCR-RFLP és szekvenálás	Fnu4HI	1088	654 és 434	-	Bernatchez & Danzmann 1993; Sušnik et al. 2001
LDH	Sejtmagi PCR-RFLP	BsII	428	353 és 75	-	McMeel et al. 2001; Marić et al. 2010
SL	Sejtmagi PCR-RFLP	MspI	566, 277 és 213	843 és 213	-	Ford 1998; Snoj et al. 2010
BFRO002	Mikroszatellit	NED	122-126	116-118	120	Sušnik et al. 1997; Jug et al. 2005
OMM1064	Mikroszatellit	VIC	173-282	172-261	178, 204	Rexroad et al., 2002; Lerceteau-Köhler & Weiss 2006; Bogataj 2010
Ssa408uos	Mikroszatellit	PET	231-282	211-227	219, 233, 235, 239, 243, 255, 258	Carney et al., 2000; Lerceteau-Köhler & Weiss 2006; Bogataj 2010
SsoSL417	Mikroszatellit	FAM	158, 169, 179, 194	173, 175, 190, 191, 197	177, 181, 184	Slettan et al., 1995; Lerceteau-Köhler & Weiss 2006; Bogataj 2010
SsoSL438	Mikroszatellit	FAM	95, 103, 108, 110	97, 99, 105	101, 106	Slettan et al., 1996; Lerceteau-Köhler & Weiss 2006; Bogataj 2010
sdY	Ivar-specifikus (Y kromoszóma)	-	-	-	-	Yano et al. 2013

ANYAG ÉS MÓDSZER

MARKEREKRE ALAPOZOTT TENYÉSZÉSI RENDSZER



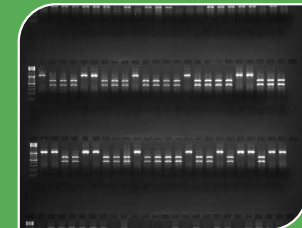
Altatás



Mintavétel

id	id	id	id	id	id
027	L801	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
048	L802	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
051	L803	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
052	L804	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
053	L805	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
054	L806	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
055	L807	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
056	L808	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
057	L809	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
058	L810	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
059	L811	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
060	L812	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
061	L813	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
062	L814	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
063	L815	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
064	L816	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
065	L817	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
066	L818	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
067	L819	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
068	L820	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09

Adatbázis építés



Genotipizálás



PIT jelölés



Alias
rögzítése

id	id	id	id	id	id
027	L801	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
048	L802	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
051	L803	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
052	L804	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
053	L805	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
054	L806	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
055	L807	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
056	L808	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
057	L809	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
058	L810	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
059	L811	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
060	L812	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
061	L813	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
062	L814	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
063	L815	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
064	L816	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
065	L817	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
066	L818	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
067	L819	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09
068	L820	2011.10.11.	2011.10.11.	Herlykifarmosny	09

Pontozás

Szo	SL417	SL438	Var	Duna	Riska	Duna	Genetikai	
					allélok	allélok	azonosító	
3	1222	1222	NO	NO	1	0*	3	3.1222_3
5	1222	1222	NO	NO	1	0*	3	3.1222_3
6	1222	1222	NO	NO	1	0*	3	3.1222_3
8	1222	1222	NO	NO	1	0*	3	3.1222_3
9	1222	1222	NO	NO	1	0*	3	3.1222_3
11	1222	1222	NO	NO	1	0*	4	4.1222_4
12	1222	1222	NO	NO	1	0*	5	5.1222_5
14	1222	1222	NO	NO	1	0*	2	2.1222_2
16	1222	1222	NO	NO	1	0*	1	1.1222_1
17	1222	1222	NO	NO	1	0*	4	4.1222_4
18	1222	1222	NO	NO	1	0*	4	4.1222_4
19	1222	1222	NO	NO	1	0*	5	5.1222_5
20	1222	1222	NO	NO	2	0*	4	4.1222_4
21	1222	1222	NO	NO	2	0*	3	3.1222_3
22	1222	1222	NO	NO	1	0*	5	5.1222_5

Azonosító

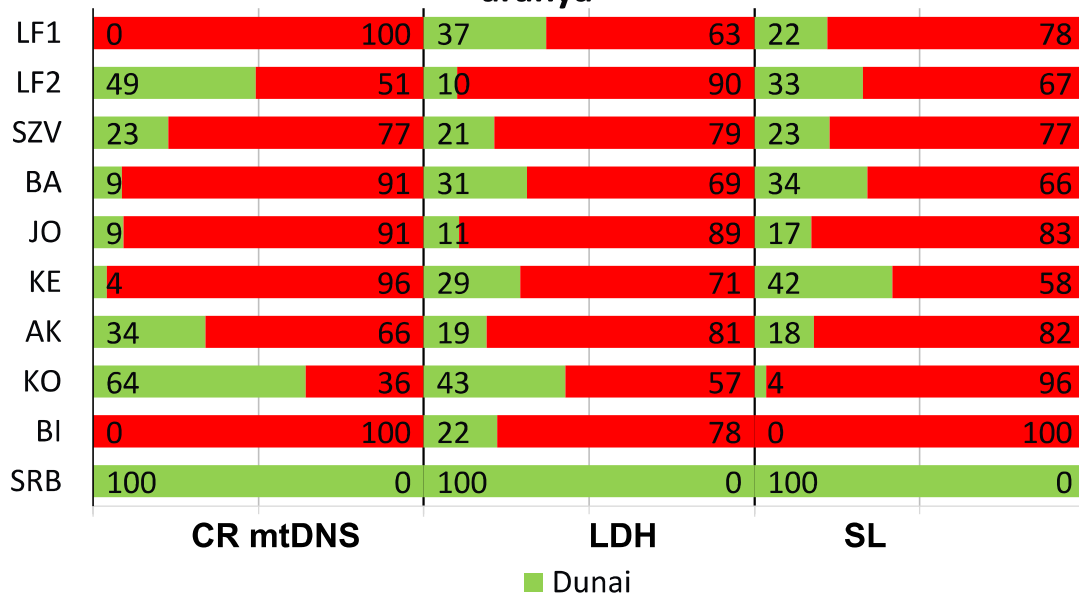


EREDMÉNYEK

EVOLUCIÓS VONALAK ÉS IVAROK ARÁNYA

Hazai populációkban atlanti túlsúly, nincs tisztán dunai egyed.
Legtöbb esetben a hímek magasabb aránya.

Dunai és atlanti haplotípusok és allélok százalékos aránya



Populáció	N	Ikrás (%)	Dunai CR mtDNS (%)	Ikrás dunai CR mtDNS (%)
LF1	401	n.a.	0,3	0
LF2	243	49,0	49,0	25,9
SZV	75	51,0	22,7	9,3
BA	25	26,1	8,7	4,4
JO	33	36,4	9,1	3,0
KE	24	50,0	4,2	0
AK	50	44,0	34,0	16,0
KO	14	35,7	64,3	28,6
BI	9	22,2	0,0	0
SRB	14	42,9	100,0	42,9



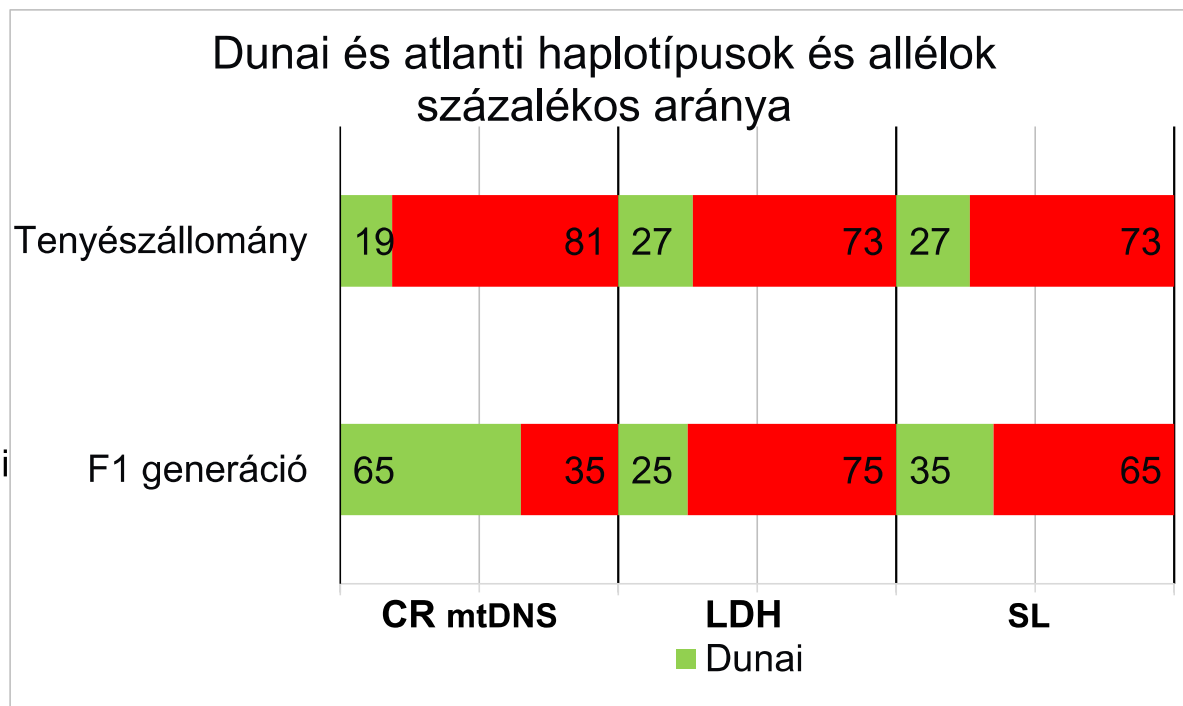
A lillafüredi állományokban (összesen 644 egyed)

- 63 db dunai CR mtDNS ikrás egyed
- A sejtmagi allélok átlagos pontszáma 3 (0-9)



F1 generáció

- Szaporítás: 2014. november
- 30 egyed vizsgálata
- CR mtDNS és SL lókuszon dunai arány növekedése



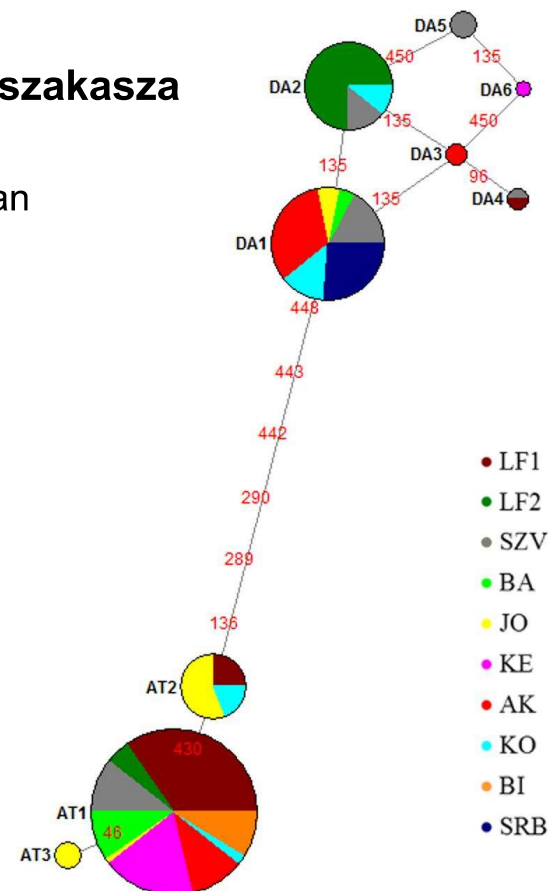
EREDMÉNYEK

MIROKONDRIÁLIS DNS HAPLOTÍPUSOK

205 egyed mtDNS kontroll régiójának 753 bp hosszúságú szakasza

- 11 polimorf hely, 9 haplotípus, 2 haplocsoport (atlanti és dunai)
- 3 atlanti, 6 dunai, amiből 1 új dunai haplotípus a Kémence-patakban

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



EREDMÉNYEK

POPULÁCIÓGENETIKA – POPULÁCIÓN BELÜLI VARIANCIA



Átlagos és effektív allélszám, allélgazdagság

PCR-RFLP-k: 1,00-2,00 közt

Mikroszatellitek:

3,8-18,6 / 2,1-7,5 / 4,8-7,3

Min: BI és homozigóta szerb kontroll

Max: BA, JO és tenyészállományok

A legtöbb állományban HW egyensúly áll fenn

Kivéve LF1 és KE állományban, mindkét esetben az SL lókuszon mért heterozigóta többlet miatt.

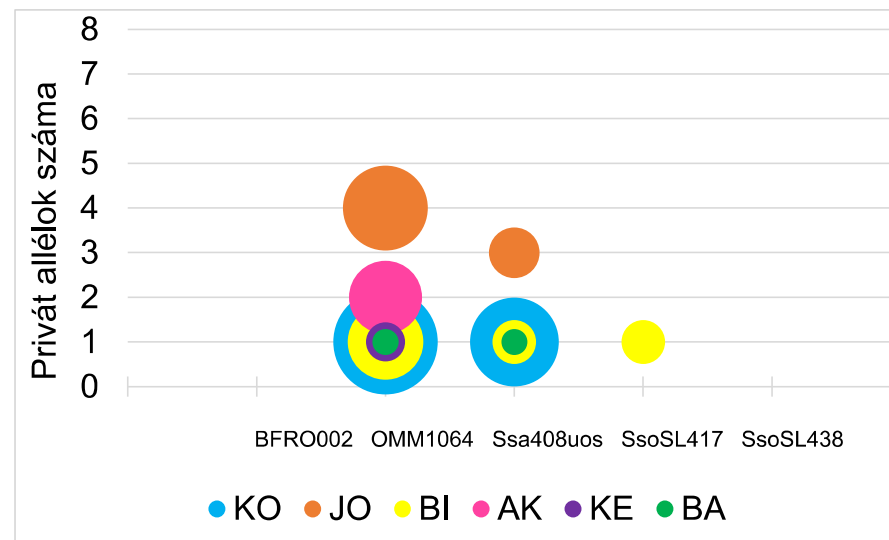
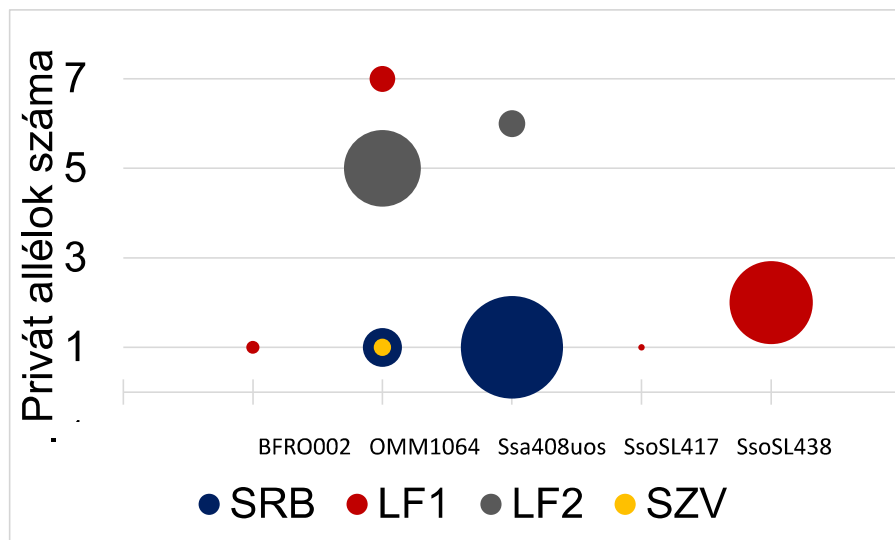
Allélgyakorisággal
↓
Átlagos allélszám
↓
I korrigált
↓
Mintaszámmal korrigált

Populáció	N	Marker	N _{ma}	N _{eff}	Ar	He	Ho	F _{is}	HWE
LF 1	401	PCR-RFLP	2	1,70	2,00	0,41	0,44	-0,09	**
		MS loci	16,2	6,92	6,90	0,77	0,78	-0,01	ns
LF 2	243	PCR-RFLP	2	1,52	1,93	0,31	0,31	0,03	ns
		MS loci	18,6	7,00	6,85	0,74	0,78	-0,06	ns
SZV	75	PCR-RFLP	2	1,52	1,99	0,35	0,37	-0,08	ns
		MS loci	10,6	6,27	7,28	0,76	0,77	0,00	ns
BA	25	PCR-RFLP	2	1,79	2,00	0,45	0,52	-0,16	ns
		MS loci	10,5	7,15	7,10	0,81	0,88	-0,09	ns
JO	33	PCR-RFLP	2	1,32	1,94	0,24	0,28	-0,16	ns
		MS loci	12,3	7,45	6,87	0,69	0,68	0,02	ns
KE	24	PCR-RFLP	2	1,83	2,00	0,46	0,71	-0,56	***
		MS loci	6,8	3,76	4,82	0,69	0,69	-0,01	ns
AK	50	PCR-RFLP	2	1,43	1,98	0,31	0,29	0,05	ns
		MS loci	8,3	4,84	5,61	0,68	0,67	0,01	ns
KO	14	PCR-RFLP	2	1,52	1,88	0,29	0,32	-0,11	ns
		MS loci	5,8	3,99	5,77	0,63	0,69	-0,09	ns
BI	9	PCR-RFLP	1,5	1,26	1,50	0,18	0,22	-0,23	ns
		MS loci	4,8	3,42	5,00	0,73	0,71	0,03	ns
SRB	14	PCR-RFLP	1	1,00	1,00	0,00	0,00	NA	NA
		MS loci	3,8	2,12	4,81	0,57	0,57	-0,01	ns



Az egyes populációkra jellemző privát allélok minden állományban megjelentek

- 42 privát allél, az összes allél 30%-a (főként OMM1064 és Ssa408uos lókuszokon)
- Legtöbb (11 db) a két lillafüredi tenyészállományban
- Természetes populációk közt legnagyobb arányban a Bittva- (6 és 16%) és Kölöntés-patakban (23 és 32%)



EREDMÉNYEK POPULÁCIÓGENETIKA – POPULÁCIÓK KÖZTI VARIANCIA

1.



F_{ST}

PCR-RFLP:

- szerb kontroll populáció szignifikánsan eltér a többitől

Mikroszatellitek:

- minden populáció közt közepes és nagymértékű szignifikáns genetikai eltérés (átlag $F_{ST}=0,110 \pm 0,039$)

	LF1	LF2	SZV	BA	JO	KE	AK	KO	BI	SRB
LF1		0.104***	0.027*	0.011	0.078**	0.043	0.037*	0.029	0.059	0.558***
LF2	0.075***		0.034**	0.055	0.036	0.052	0.045*	0.231***	0.153*	0.675***
SZV	0.060***	0.047***		0.018	0.013	0.044	0.004	0.094	0.048	0.674***
BA	0.085***	0.086***	0.063***		0.086*	0.007	0.042	0.102	0.119	0.615***
JO	0.076***	0.106***	0.042***	0.082***		0.116**	0.001	0.180*	0.061	0.814***
KE	0.132***	0.099***	0.100***	0.081***	0.154***		0.076	0.162***	0.178***	0.592***
AK	0.130***	0.075***	0.067***	0.089***	0.105***	0.136***		0.096	0.024	0.733***
KO	0.162***	0.156***	0.125***	0.119***	0.126***	0.156***	0.131***		0.047	0.812***
BI	0.108***	0.125***	0.098***	0.096***	0.125***	0.157***	0.184***	0.217***		<u>0.920***</u>
SRB	0.222***	0.247***	0.235***	0.234***	0.321***	0.287***	0.293***	0.369***	0.255***	



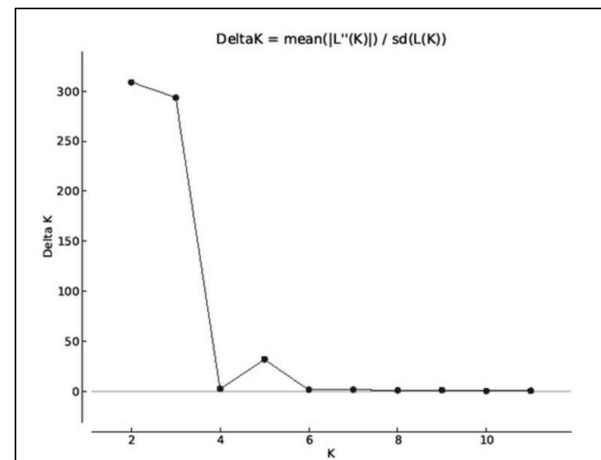
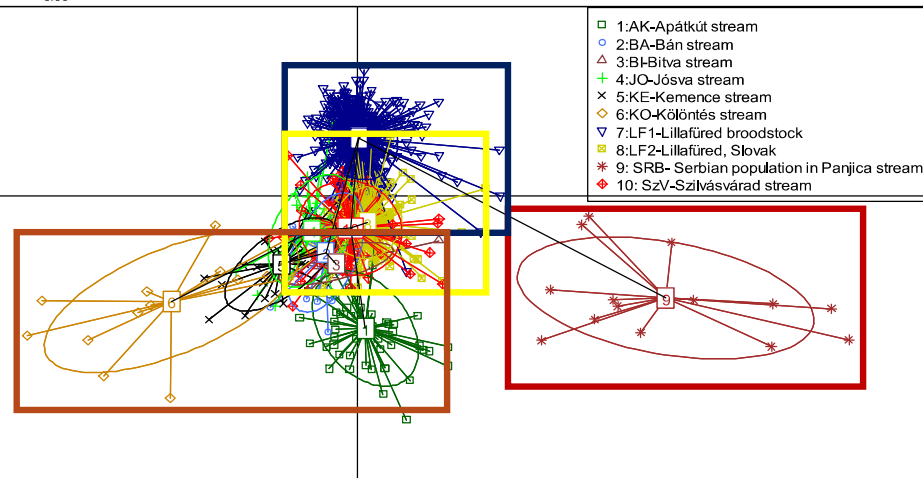
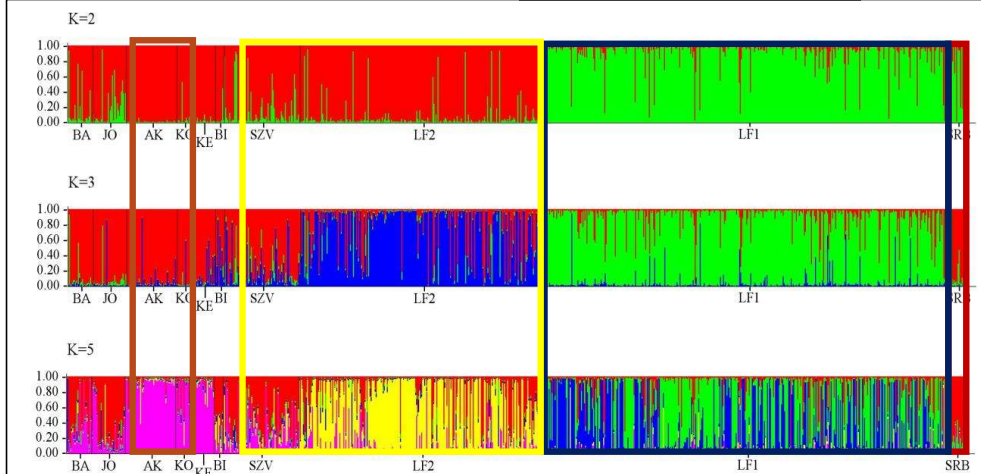
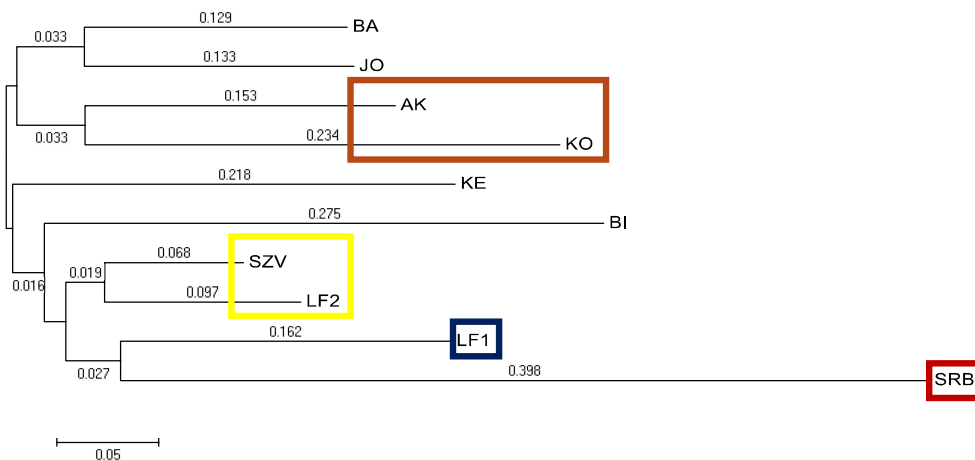
Nei-féle genetikai távolság

- a szerb kontroll állomány esetén a legnagyobb távolság ($D_a=0,537-0,682$)
- a hazai populációk közt a legnagyobb genetikai távolság ugyanott, mint F_{ST} esetén: BI-KO

	LF1	LF2	SZV	BA	JO	KE	AK	KO	BI
LF2	0,268								
SZV	0,272	0,165							
BA	0,376	0,348	0,301						
JO	0,349	0,369	0,226	0,262					
KE	0,472	0,344	0,344	0,340	0,451				
AK	0,456	0,309	0,270	0,336	0,358	0,392			
KO	0,502	0,422	0,360	0,472	0,398	0,504	0,386		
BI	0,477	0,395	0,407	0,452	0,438	0,497	0,530	0,582	
SRB	0,560	0,558	0,537	0,632	0,694	0,679	0,589	0,657	0,682

EREDMÉNYEK

POPULÁCIÓGENETIKA – POPULÁCIÓK KÖZTI VARIANCA 2.





A hazai sebespisztráng-állományok evolúciós vonalainak vizsgálata során

Többségében atlanti túlsúly tapasztaltunk.

A vizsgált markerekre nézve „tisztán” dunai egyedeket nem találtunk.

Azonban egy új dunai haplotípust írtunk le a Kemence-patakban.



A sebespisztráng-állományok populációgenetikai felmérése során

Megállapítottam, hogy a populációk többségében Hardy-Weinberg egyensúly áll fenn.

Számos új, privát allélt találtam, azonban a hazai populációk nem különíthetők el egyértelműen egymástól.

A vizsgált állományok közti genetikai keveredést az evolúciós vonalakon túl, a populációgenetikai mutatókkal is igazoltam.



Markerekre alapozott egyedi azonosító és tenyésztési rendszer kialakítása Lillafüreden

Egyszerű és hatékony rendszert hoztunk létre, amivel sikerült a dunai vonal arányát növelni.

Süllő – Az újonnan fejlesztett markerek jellemzése

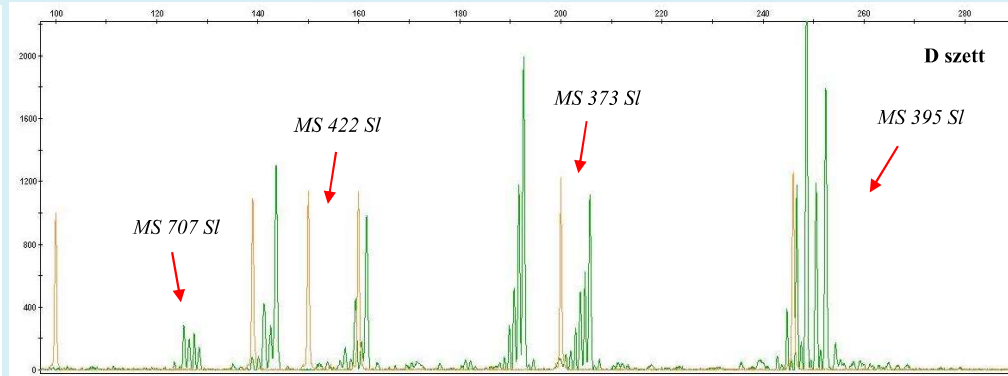
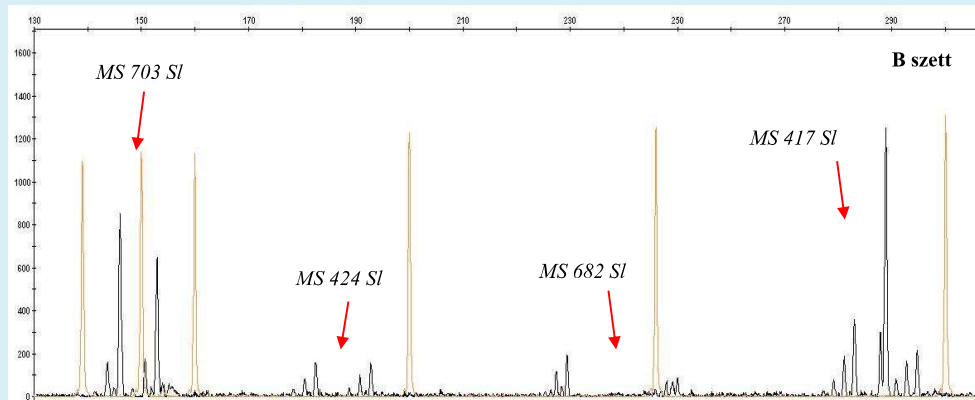
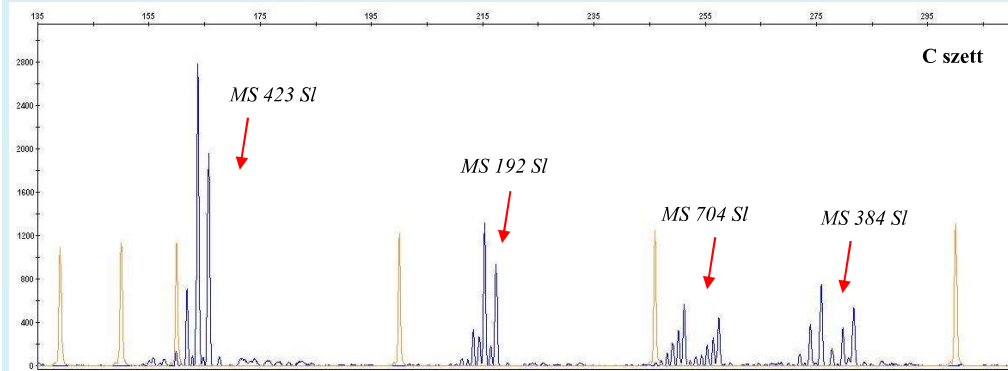
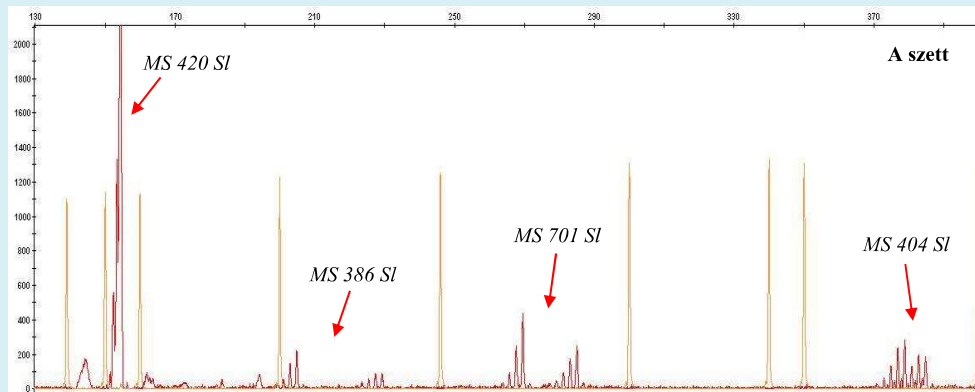
- 34 működőképes marker mind polimorfnak bizonyult
- detektált allélok száma 3-20 között alakultak lókuszonként
- A legtöbb allélt (20) az *MS 260 SI* markerrel tudtuk detektálni, de magas a polimorfítása az *MS 84 SI*, *MS 192 SI*, *MS 412 SI*, valamint az *MS 424 SI* markereknek is.
- Meghatároztuk a markerek ismétlődő egységeinek a szekvenciáját, a detektált allélok számát és mérettartományukat, továbbá a lókuszonkénti várt és megfigyelt heterozigotizációkat, ezek különbségének szignifikanciáját, valamint a markerek PIC értékét a vizsgált egyedszám függvényében

Mikroszatellit marker	Az ismétlődést tartalmazó mikroszatellit régió szekvenciája	Vizsgált egyedszám	Detektált allélok száma	Allél mérettartomány (bázispár)	H _E	H _O	HWE	PIC	Génbanki azonosító
MS 84 SI	(CA) ₂₂	168	19	114-181	0,860	0,685	*	0,843	KX375356
MS146 SI	(CA) ₇	293	5	116-144	0,086	0,068	***	0,084	KX375357
MS150 SI	(CA) ₈	293	3	112-117	0,107	0,079	ns	0,101	KX375358
MS 192 SI [#]	(TG) ₁₉	376	17	190-229	popgen analízisben				KX375359
MS 195 SI [#]	(AC) ₁₇	376	7	94-106	popgen analízisben				KX375360
MS 198 SI [#]	(CA) ₃₁	376	3	514-527	popgen analízisben				KX375361
MS 203 SI [#]	(AC) ₁₆	376	7	133-144	popgen analízisben				KX375362
MS 204 SI	(TG) ₂₂	8	7	131-162	0,839	0,683	**	0,787	KX375363
MS 260 SI [#]	(TG) ₂₆	376	20	165-208	popgen analízisben				KX375364
MS 268 SI [#]	(CA) ₉	376	3	223-227	popgen analízisben				KX375365
MS 373 SI	(AC) ₁₆	8	9	169-200	0,867	1,000	ns	0,844	KX375366
MS 384 SI	(AC) ₉ N ₁₀ (AC) ₁ 9N ₁₈ (AC) ₁₁	8	5	257-278	0,917	0,750	ns	0,641	KX375367
MS 386 SI	(AC) ₃₅	8	9	169-229	0,725	0,500	ns	0,799	KX375368
MS 389 SI	(AC) ₂₇	8	6	208-242	0,879	0,857	ns	0,733	KX375369
MS 395 SI	(AC) ₂₅	8	7	217-253	0,817	1,000	ns	0,725	KX375370
MS 397 SI [#]	(CT) ₈ N ₁₉ (CA) ₁ 5	376	7	155-173	popgen analízisben				KX375371
MS 404 SI	(TG) ₂₃	8	5	330-359	0,792	0,375	*	0,701	KX375372

Mikroszatellit marker	Az ismétlődést tartalmazó mikroszatellit régió szekvenciája	Vizsgált egyedszám	Detektált allélok száma	Allél mérettartomány (bázispár)	H _E	H _O	HWE	PIC	Génbanki azonosító
MS 410 SI	(AC) ₂₃	8	6	240-263	0,842	0,750	ns	0,759	KX375373
MS 412 SI	(TG) ₂₄ (TC) ₃₈	8	10	184-267	0,942	0,750	ns	0,871	KX375374
MS 416 SI	(AC) ₁₅	8	6	91-123	0,747	0,857	ns	0,664	KX375375
MS 417 SI	(CA) ₂₀ N ₃₄ (AC) ₅	8	7	260-281	0,825	0,750	ns	0,741	KX375376
MS 420 SI	(AC) ₁₃	8	5	124-144	0,683	0,875	ns	0,584	KX375377
MS 422 SI	(TG) ₂₀ N ₁₄ (GT) ₁₆	8	4	123-144	0,725	0,250	**	0,624	KX375378
MS 423 SI	(AC) ₂₀	8	5	144-163	0,775	0,375	**	0,682	KX375379
MS 424 SI	(TG) ₁₄ N(GT) ₁₆	8	10	152-181	0,942	0,875	ns	0,871	KX375380
MS 673 SI	(TG) ₃₀	8	3	212-220	0,692	0,375	ns	0,575	KX375381
MS 682 SI	(TG) ₃₀	8	6	204-231	0,833	0,625	ns	0,748	KX375382
MS 686 SI	(TG) ₃₅	8	3	107-114	0,575	0,500	ns	0,447	KX375383
MS 687 SI	(CA) ₂₇	8	3	135-143	0,658	1,000	ns	0,544	KX375384
MS 698 SI	(TG) ₁₈	8	5	165-201	0,675	0,625	ns	0,599	KX375385
MS 701 SI	(AC) ₂₅ N(CA) ₁₁	8	7	253-287	0,867	0,875	ns	0,787	KX375386
MS 703 SI	(TG) ₁₆	8	4	128-141	0,692	0,750	ns	0,582	KX375387
MS 704 SI	(GT) ₂₂	8	5	236-246	0,808	0,625	ns	0,717	KX375388
MS 707 SI	(AC) ₁₇	8	3	106-110	0,575	0,625	ns	0,482	KX375389

Süllő - Multiplex PCR optimalizálás eredményei

A-szett: PET, B-szett: NED, C-szett: FAM, D-szett: VIC + GeneScan 500 LIZ molekulasúly marker)



Süllő – Populáció genetikai analízis

- A kifejlesztett markerek közül 7 markert alkalmaztunk 10, Duna vízgyűjtő területéről származó populáció / állomány diverzitás vizsgálatára (összesen 376 egyed)

Populációk / Állományok:

Ak: Akasztó (21; halgazdaság);

At: Attala (21, halgazdaság);

Gy: Győr (21 intenz. recirk.);

Ti: Temesvár (20, intenz. recirk.);

Kb: Kisbajcs (78, intenz. recirk.);

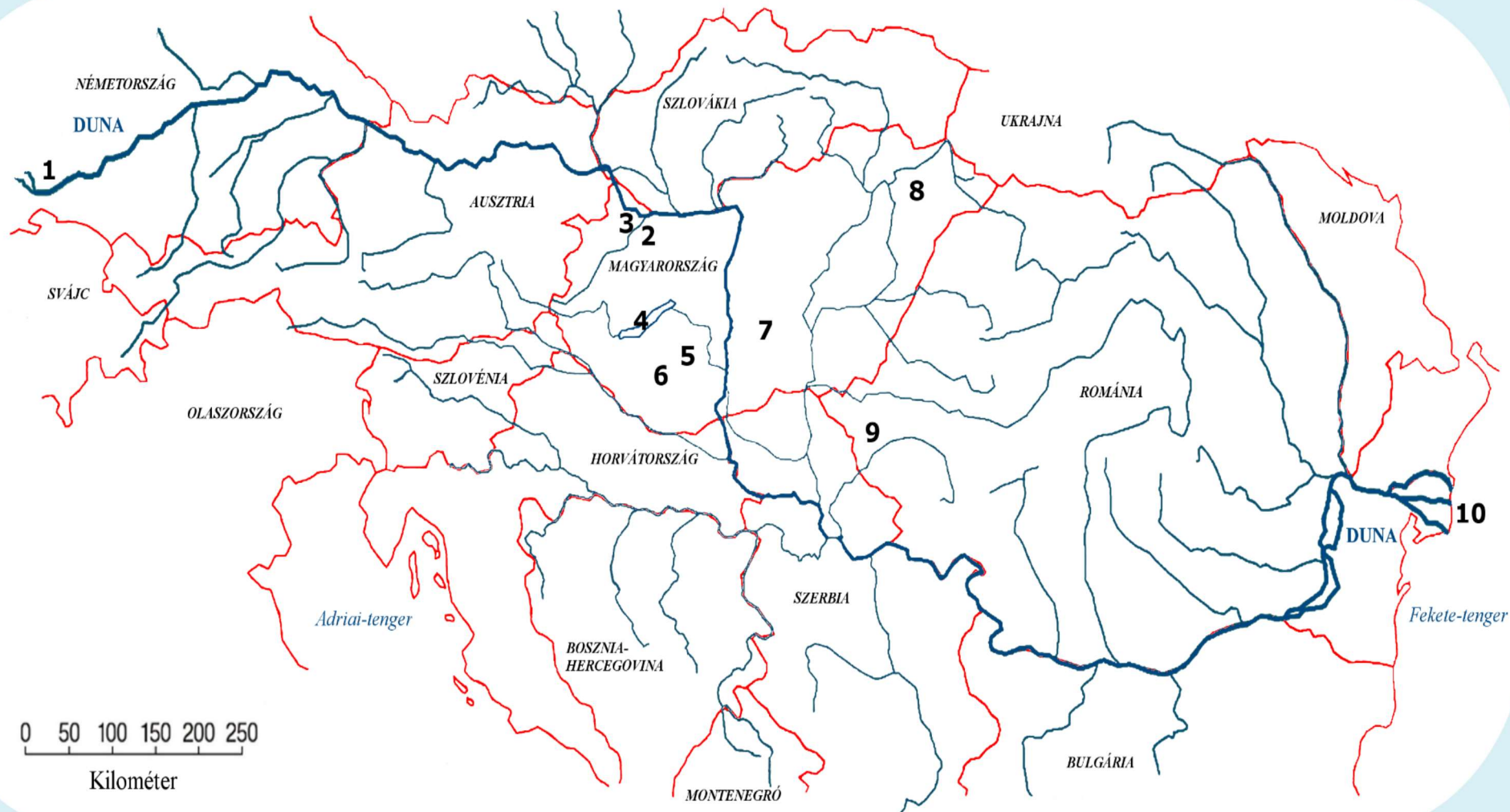
Ny: Nyíregyháza (47, halgazdaság);

Da: Dalmand (46, halgazdaság);

Ba: Balaton (60 természetes vízi);

De: Duna-delta torkolat (48 term. vízi);

Ge: Duna felső szakasza (14 term. vízi)



1: Németország (Duna felső szakasza, Ge); Magyarország: 2: Győr (Gy), 3: Kisbajcs (Kb), 4: Balaton (Ba), 5: Dalmád (Da), 6: Attala, (At), 7: Akasztó (Ak), 8: Nyíregyháza (Ny); Románia: 9: Temesvár (Ti), 10: Duna-delta torkolat (De)

Süllő – Populáció genetikai analízis

Állományok	Átlagos allélszám	Ar	H _E	H _O	HWE	Átlagos géndiverzitás	F _{IS}
Ak	4.14	3.816	0.518	0.438	*	0.508	0.157
At	3.71	3.501	0.525	0.491	*	0.520	0.066
Gy	4.29	3.769	0.454	0.415	***	0.454	0.087
Ti	2.57	2.481	0.452	0.442	ns	0.449	0.024
Kb	5.43	3.975	0.500	0.519	***	0.492	-0.038
Ny	3.86	3.273	0.466	0.458	*	0.461	0.018
Da	4.71	3.644	0.492	0.422	*	0.492	0.142
Ba	4.57	3.494	0.462	0.450	*	0.462	0.025
De	4.29	3.968	0.593	0.567	*	0.629	0.046
Ge	3.29	3.254	0.560	0.498	ns	0.484	0.024
Összes	4.09	5.320	0.615	0.478	***		

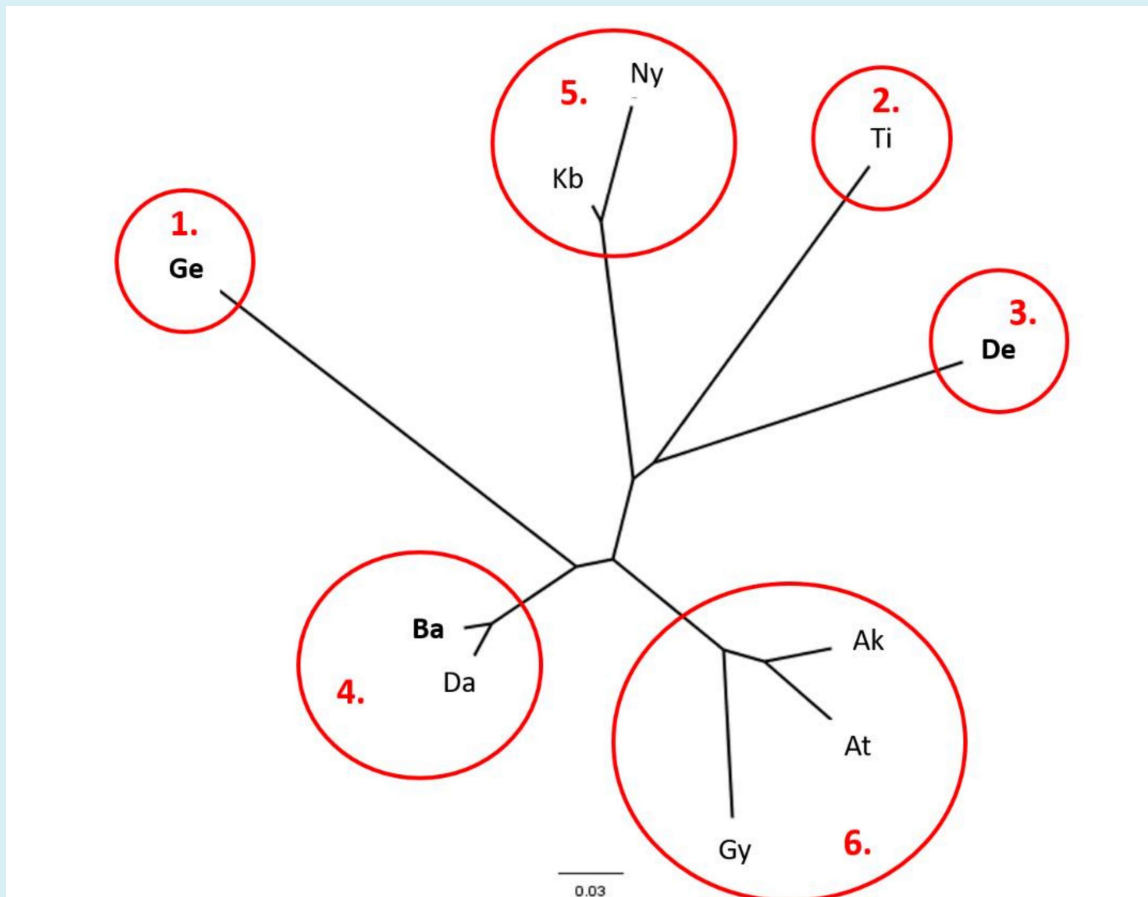
Süllő – Populáció genetikai analízis – egyedi allélok

Mikroszatellit marker	Ak	At	Gy	Ti	Kb	Ny	Da	Ba	De	Ge	Összes
MS 192 SI	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
MS 195 SI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MS 198 SI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MS 203 SI	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
MS 260 SI	1	0	1	0	2	0	0	0	3	2	9
MS 268 SI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MS 397 SI	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	3
Összes	1	1	3	1	3	0	0	0	4	2	

Süllő – Populáció genetikai analízis – $F_{ST}:0,214$

Populációk	Ak	At	Gy	Ti	Kb	Ny	Da	Ba	De
At	<u>0.0384</u>								
Gy	0.0977	0.1038							
Ti	0.2104	0.2150	0.2732						
Kb	0.1956	0.2113	0.2203	0.2140					
Ny	0.2415	0.2552	<u>0.3056</u>	0.2412	<u>0.0737</u>				
Da	0.1141	0.0808	0.1559	0.1679	0.2042	0.2565			
Ba	0.1017	0.1171	0.1670	0.1669	0.2093	0.2629	<u>0.0324</u>		
De	0.2382	0.2492	0.2704	0.2190	0.2446	0.2331	0.2663	0.2750	
Ge	0.2710	0.2436	<u>0.3706</u>	<u>0.3607</u>	<u>0.3442</u>	<u>0.3279</u>	0.2329	0.2969	0.2788

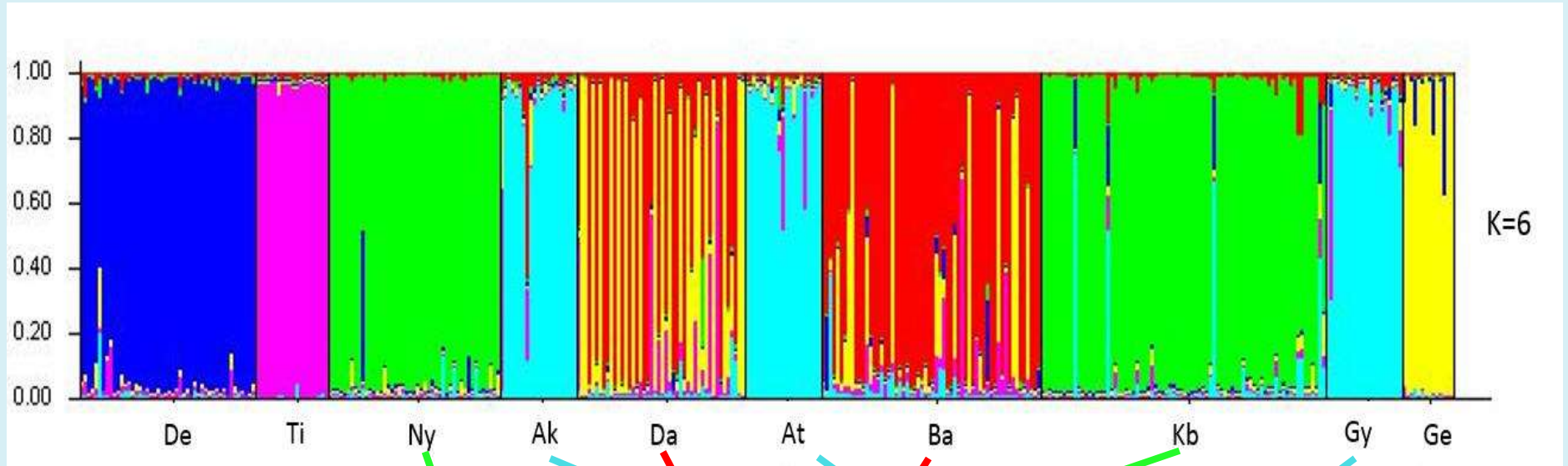
Süllő – Populáció genetikai analízis – Nei-féle genetikai távolság (1983) alapján készített filogenetikai fa (NJ)



Természetes állományok: Ge, Ba, De

Piros számmal: az önálló genetikai egységek

Süllő – Populáció genetikai analízis – STRUCTURE analízis



3.

2.

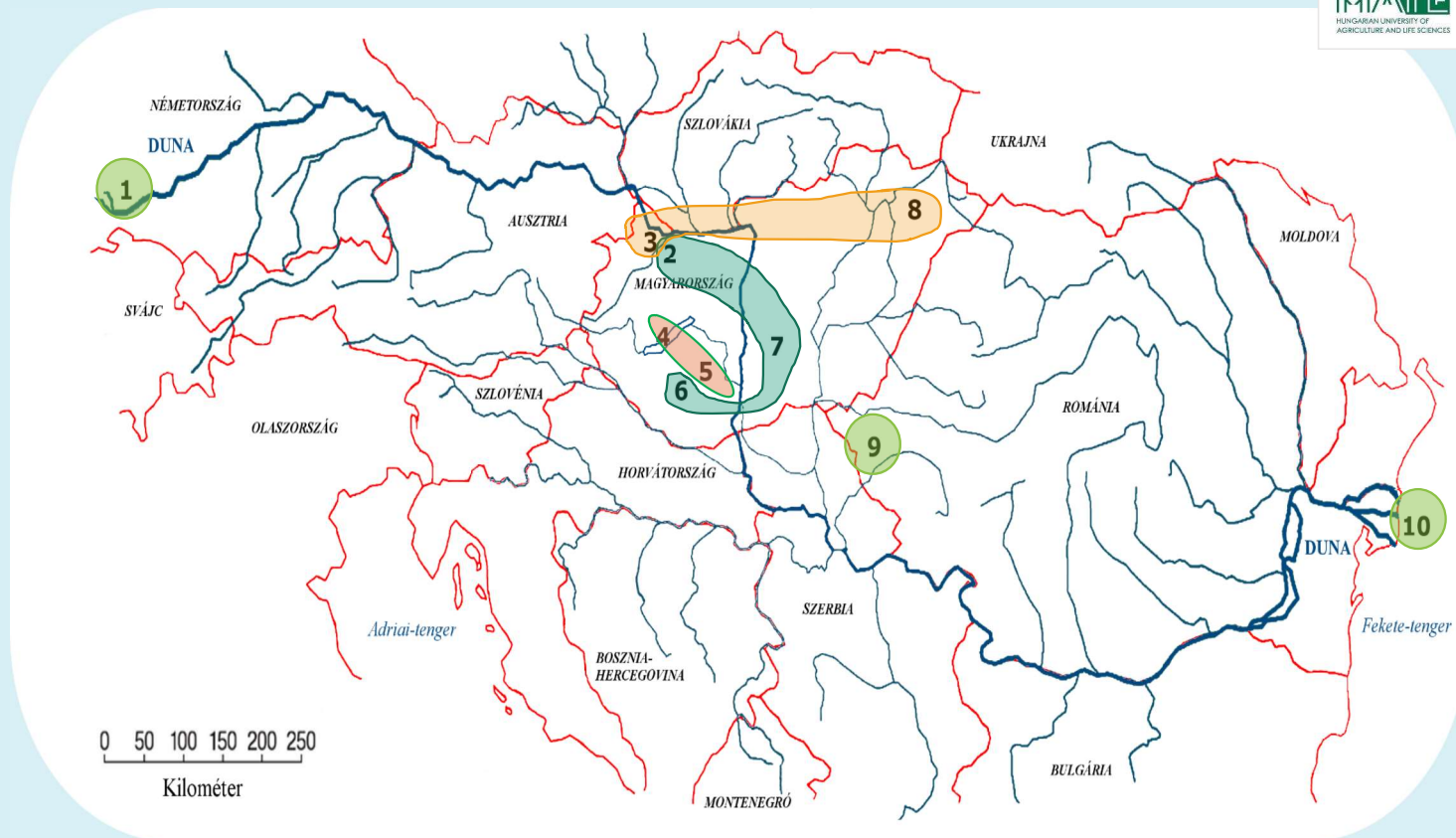
5.

4.

6.

1.

Farmd stocks do not necessarily originate from the geographically closest populations



1: Germany (**Upper section of Danub. Ge**); Hungary: 2: **Győr (Gy)**. 3: **Kisbajcs (Kb)**. 4: **Balaton (Ba)**. 5: **Dalmand (Da)**. 6: **Attala. (At)**. 7: **Akasztó (Ak)**. 8: **Nyíregyháza (Ny)**; Romania: 9: **Temesvár (Ti)**. 10: **Duna-delta estuary (De)**

GENOMIKAI ÉS SZELEKCIÓS PROGRAM AFRIKAI HARCSÁN



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet

Készítette: Dr. Kovács Balázs

Dátum 2022.03.10.

Clarias gariepinus termelő országok

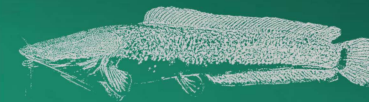
(FAO Fishery Statistics, 2006)



MATE
MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet

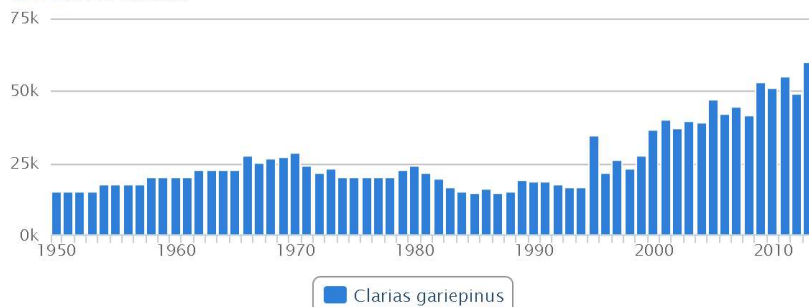


Afrikai harcsa termelés



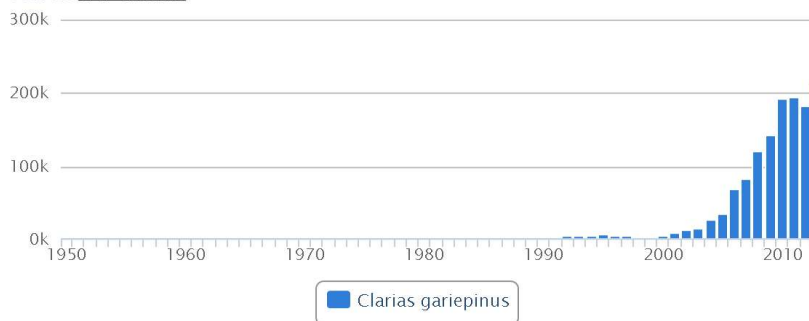
Global Capture Production for species (tonnes)

Source: [FAO FishStat](#)



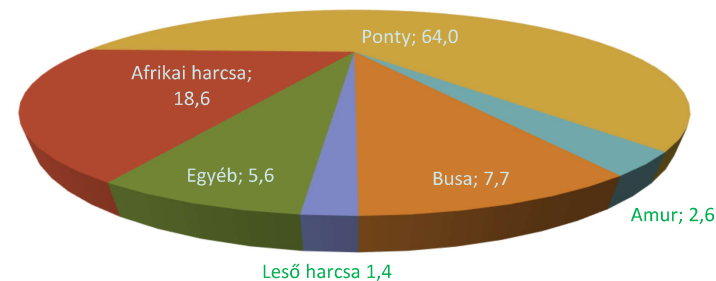
Global Aquaculture Production for species (tonnes)

Source: [FAO FishStat](#)



• Növekvő termelés

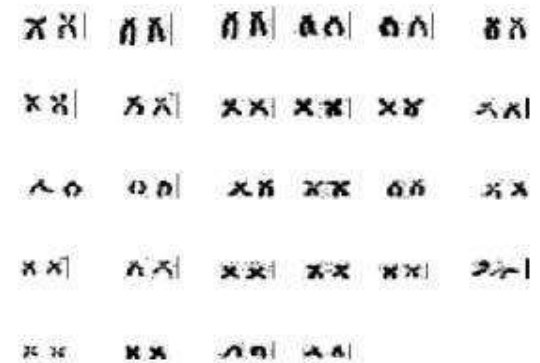
- világon: ~350 000 t/év
 - Eu: ~4500 t/év
 - Hu: ~ 3000 t/év
- Több mint 29 országban tenyésztik(FAO)
 - Magyarországon a második legnagyobb mennyiségben előállított hal



Előzetes genom információk

- $2n=28$ pár
- C-érték: 1.20 pg (Animal Genome Size Database)
- Számított genom méret: 1173 Mb

(250-1000X nagyobb mint egy bakteriális genom)

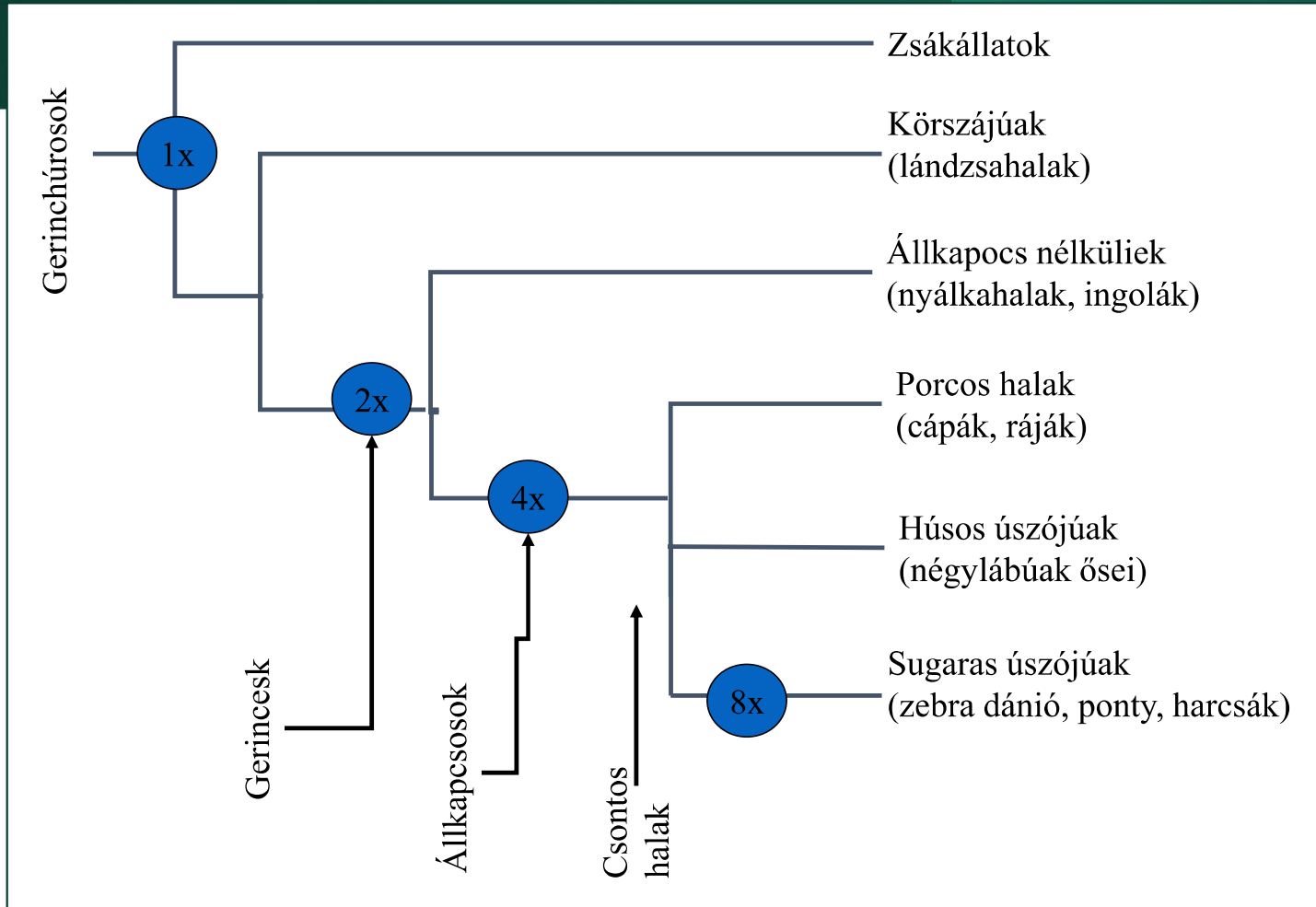


(Okonkwoand Obiakor;2010)

Ivarhoz kötött DNS-markerek keresése hazai haszonhalakban: “Molekuláris szexálási” eljárás kidolgozása

Kovács Balázs,

GENOM



HALAK IVAR DETERMINÁCIÓJA I.

- **Környezeti tényezők befolyásolják** (Baroiller et al., 1995; Nomura et al., 1998)
- **Szociális tényezők befolyásolják** (Badura and Friedman, 1988; Shapiro, 1992)
- **Morfológiailag elkülöníthető ivari kromoszóma a fajok többségénél nincs** (Ojima, 1983)

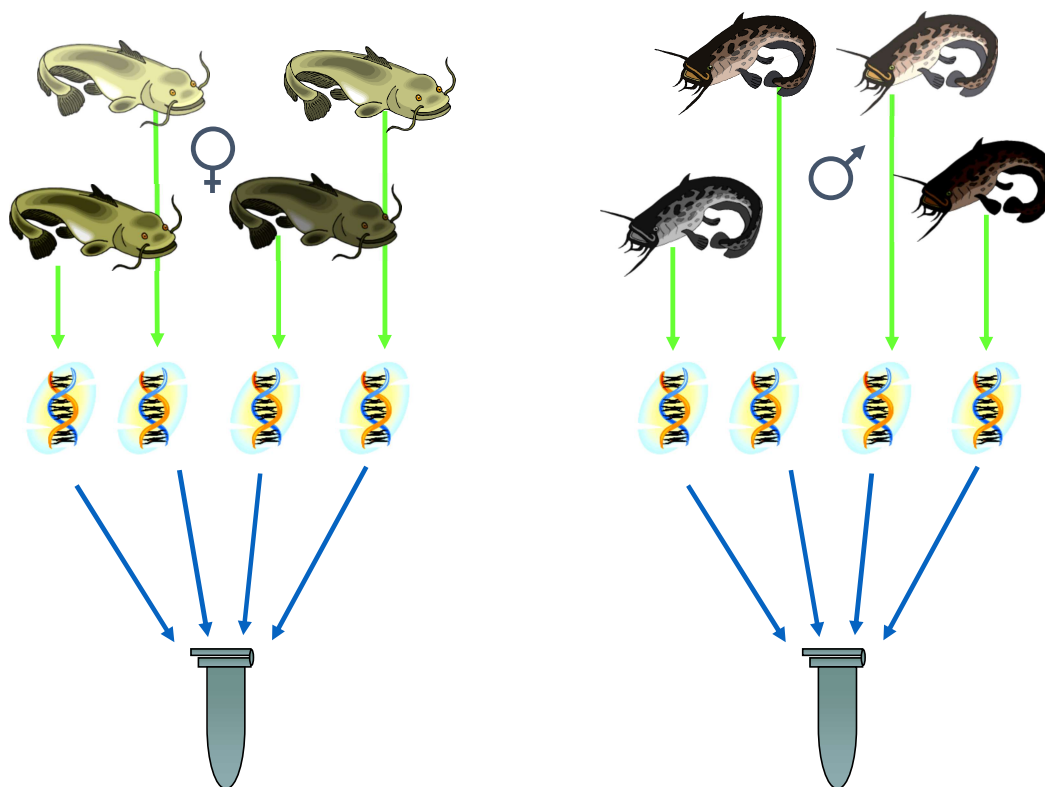
HALAK IVAR DETERMINÁCIÓJA II.

- XX/XY (Devlin et al., 1998)
- ZW/ZZ (Solari, 1994)
- X, W, Y kromoszómák a *Xiphoporus maculatus* (Gutbod and Scharl, 1999),
- ZW/ZW ' / ZZ a *Scardinius erythroptalmus* faj esetében (Koehler et al. 1995) .

A harcsafék (*Siluriformes*)

- **XX/XY** (Liu et al., 1996)
- **ZZ/ZW** (Andreatta et al.1993)
- *Ictalurus punctatus*: **GPI- β izoenzim**
Y-kromoszómához kapcsolt (Goudie et al., 1995)
- Ivarhoz kapcsolt **DNS markerek, gének nem ismertek**

DNS pool-ok



RAPD

- *Clarias gariepinus* (10 fiú, 10 lány)
- *Clarias batracus* (4 fiú, 2 lány)
- *Clarias macrocephalus* (3 fiú, 3 lány)
- *Clarias fuscus* (10 fiú, 10 lány)
- *Heterobonchus longifilis* (10 fiú, 10 lány)

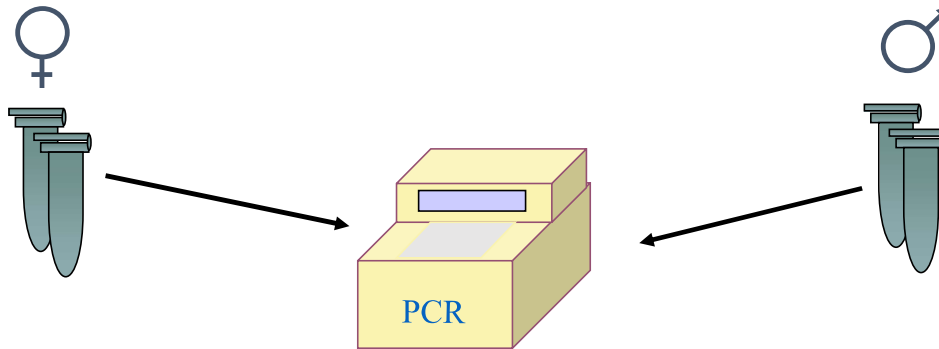
- *Tinca tinca* (50 fiú 50 lány)

300 primer

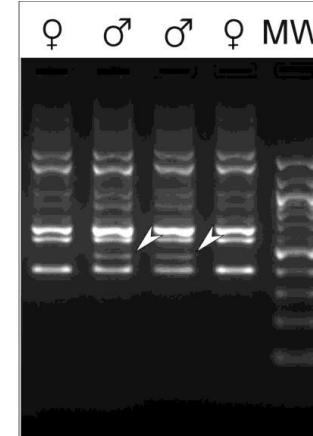
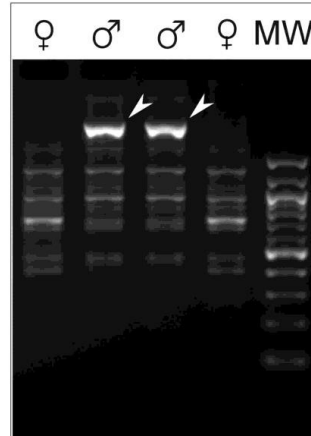
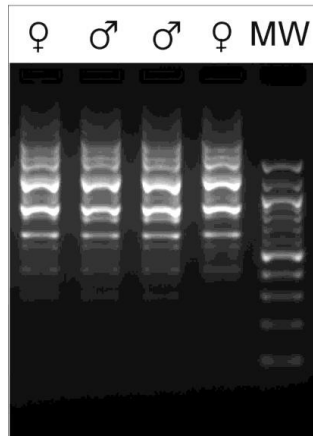
100 primer

~3500 PCR reakció

RAPD



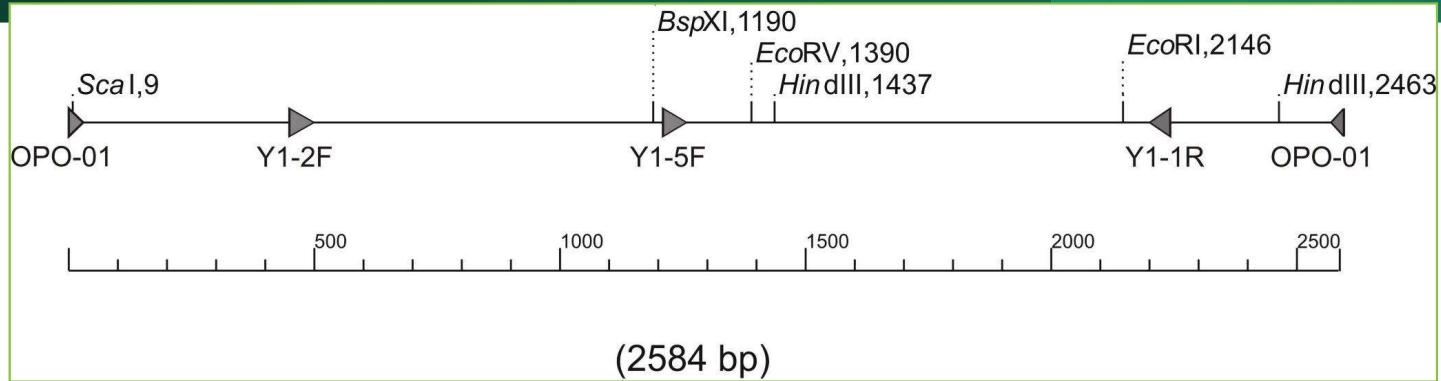
10 bp PRIMERS



ClgY1

AT/(AT+GC) = 61%

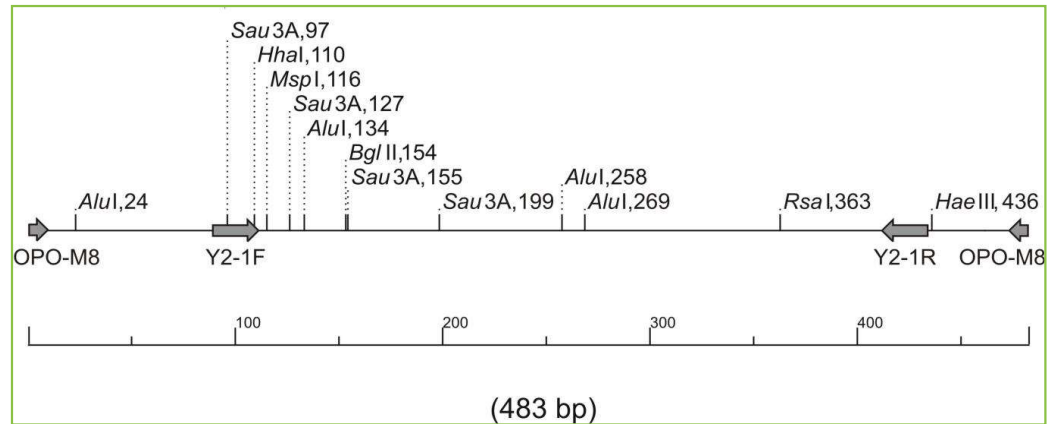
GenBank: AF332597



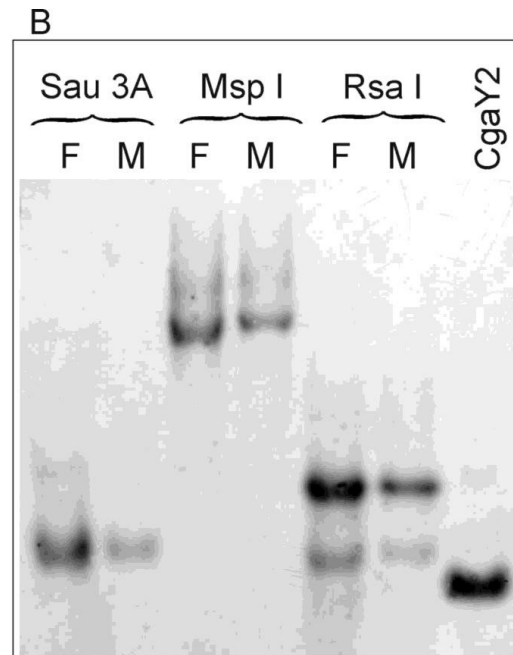
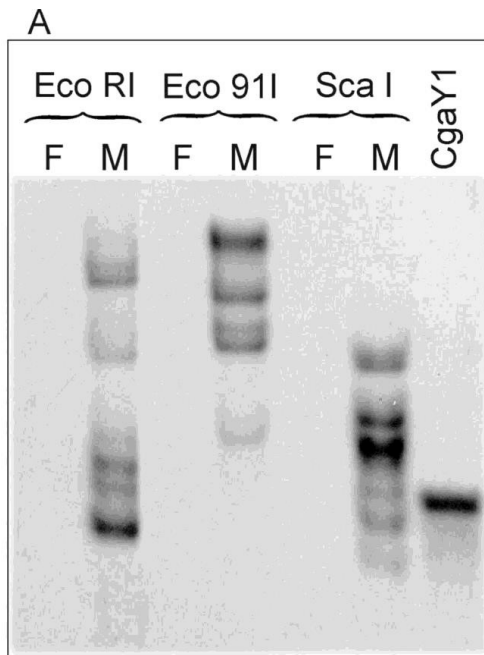
ClgY2

AT/(AT+GC) = 61%

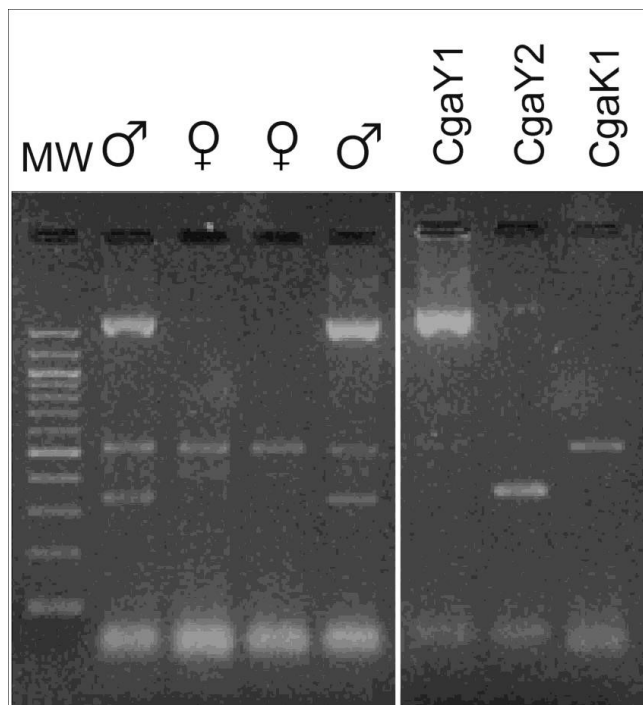
GenBank:
AF332598



SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓ

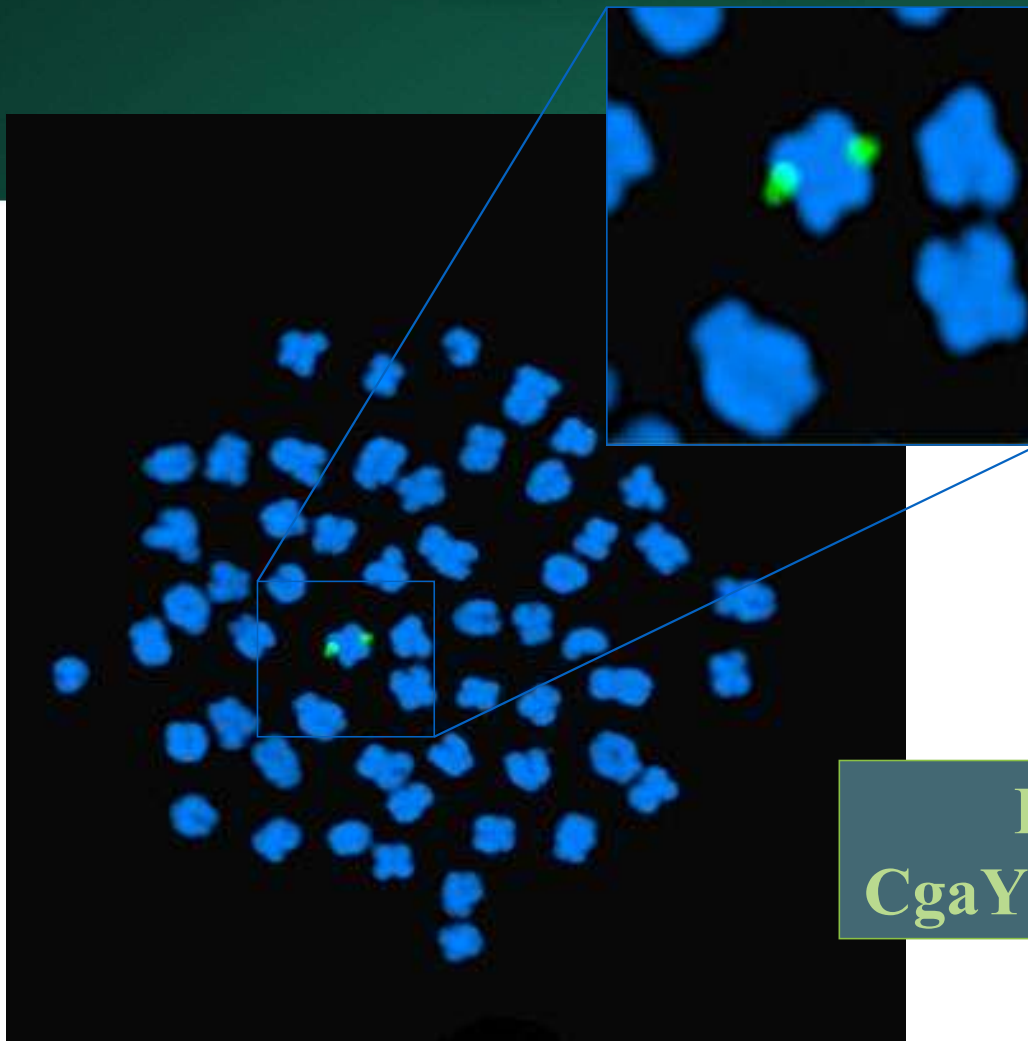


Triplex



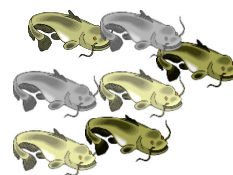
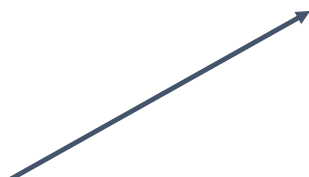
Felnevelési tesztek

Felnevelés	egyedszám	Ivarmeghatározás
Csoportos (Simplex PCR)	50	84%
Csoportos (Duplex PCR)	179	95%

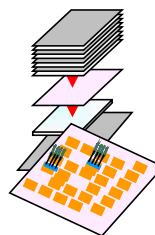


FISH
CgaY1próbával

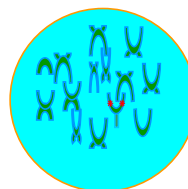
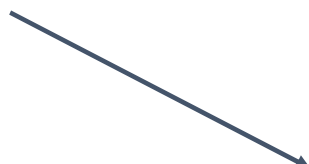
Potenciális
markerek
izolálása,
szekvenálása



Ellenőrzés egyedi
mintákon

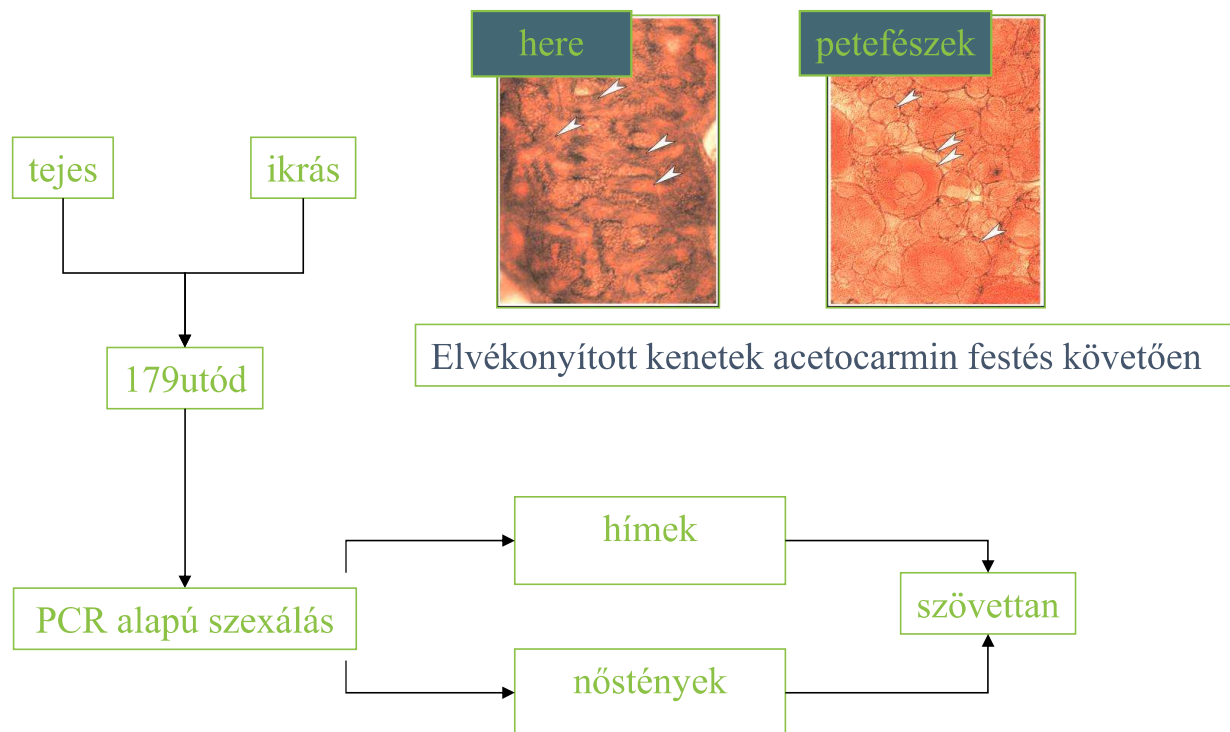


Southern
hibridizáció



FISH
Kromoszóma
hibridizáció

Az ivarspecifikus markerek alkalmazása a fenotípusos ivar előrejelzésére



Ivar előrejelzés eredménye

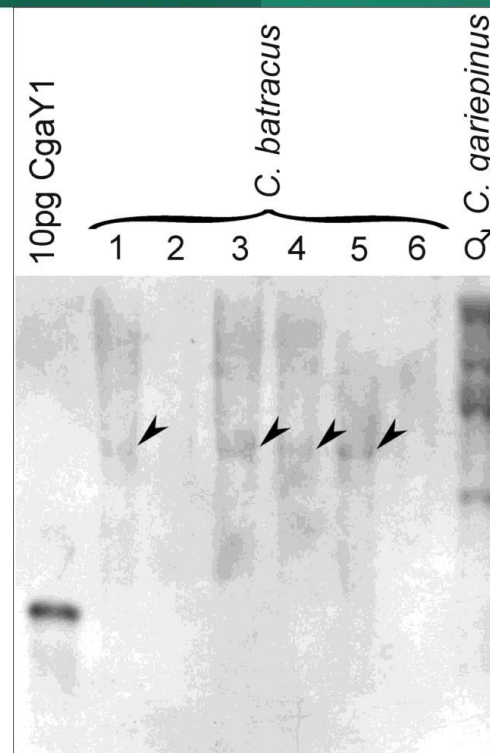
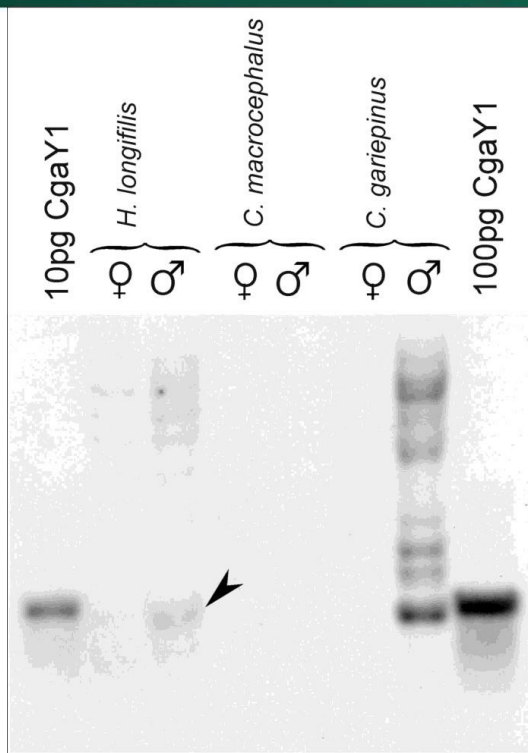
	CgIY1 test	phenotype	difference	Efficiency
Male	87	82	5	94,2 %
Female	92	91	1	98,9 %
Total	179	173	6	96,6 %

Genetikai távolság a marker és a gén között ~3,4 cM
(1 cM megközelítőleg 500-600 kb DNS zebradánióban)

Homológok keresése

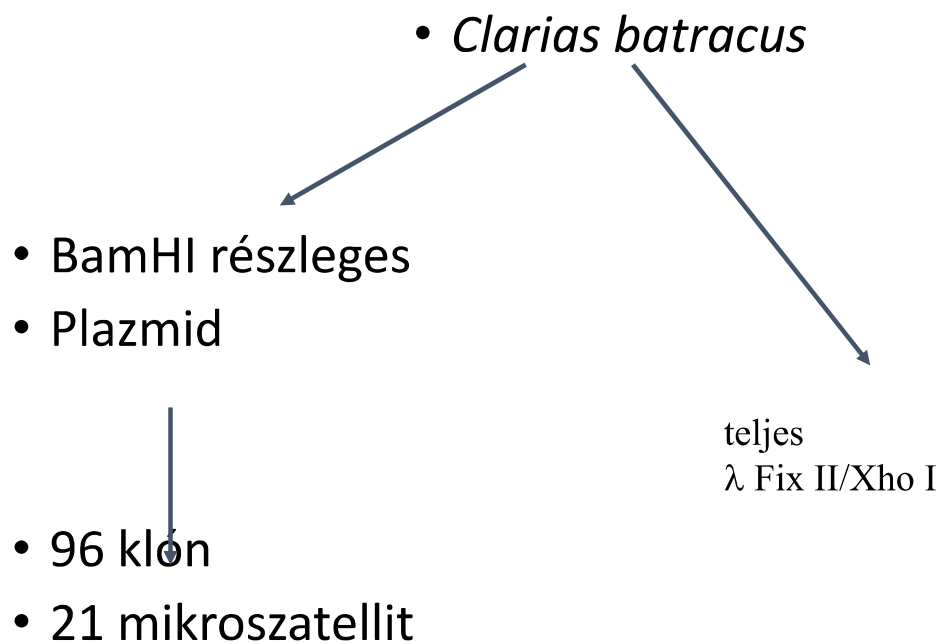
- RAPD
- Specifikus primer párokkal
- Low stringency gradient PCR (LP-RAPD)
- Könyvtárak

ZOO- HIBRIDIZÁCIÓ

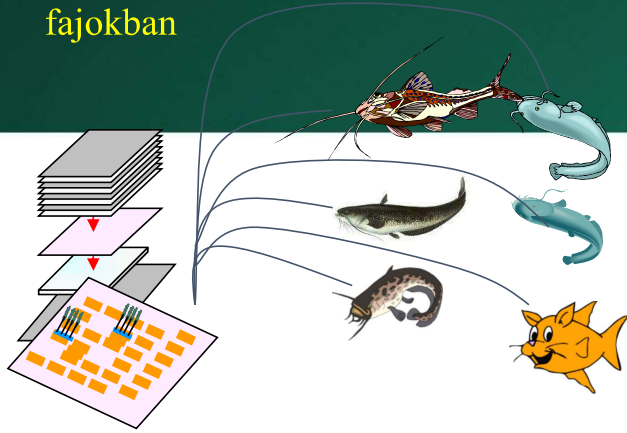


Taxonomiai eloszlás

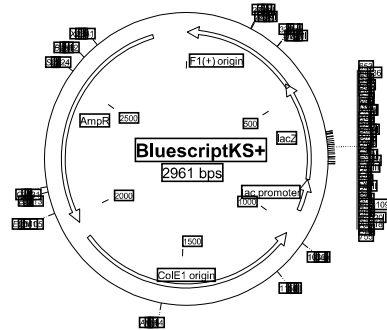
Family	Species	Hybridizing fragments	
		ClgY1	ClgY2
Clariidae	<i>Clarias gariepinus</i>	Only in males	In both sexes
	<i>Clarias fuscus</i>	In both sexes	In both sexes
	<i>Clarias batrachus</i>	In both sexes	In both sexes
	<i>Clarias macrocephalus</i>	No signal	In both sexes
	<i>Heterobranchus longifilis</i>	Different btw the two sexes	In both sexes
Callichthyidae	<i>Hoplosternum thoracatum</i>	No signal	No signal
	<i>Hoplosternum litorale</i>	No signal	No signal
	<i>Corydoras aeneus</i>	No signal	No signal
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	No signal	No signal
	<i>Heteropneustes fossilis</i>	No signal	No signal
Ictaluridae	<i>Ictalurus punctatus</i>	No signal	No signal
Pimelodidae	<i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	-	



Homológok keresése rokon fajokban



Homológok izolálása részleges genomikus könyvtárból



Microsatellitek tesztelése rokon fajokban



Microsatellit szekvenciák

Ivari marker

- Szaporítás:
 - P0: 3 keresztezés, 3 pár
 - F1: testvér keresztezés
 - F2 -> kísérleti anyaállomány
 - F3 -> kontroll

Marker

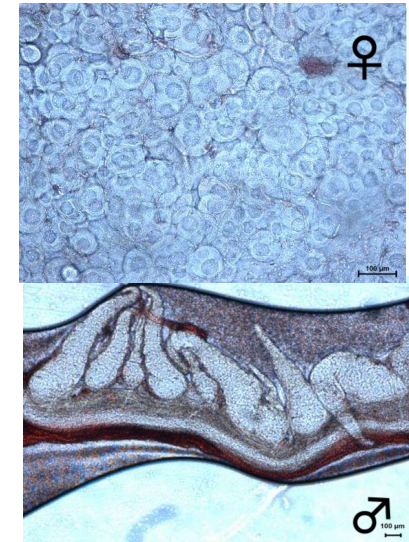
✓

85, 86, 89 egyed
50, 48, 94 egyed

Fenotípus

ivari papilla
aceto-kármin

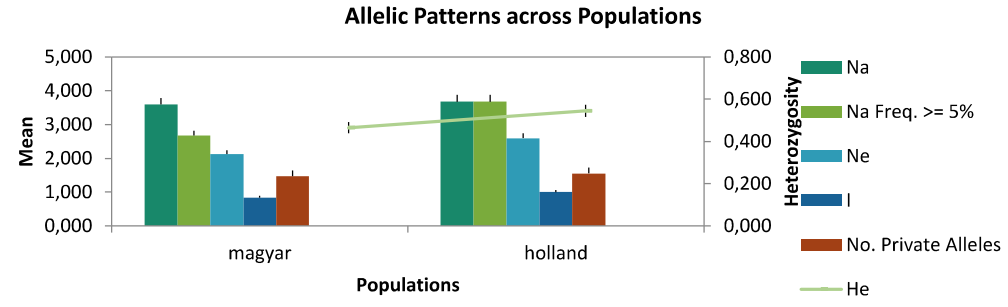
Csoport	N	Rekombináció	Megbízhatóság (%)	Tejes	Ikrás
F2 A	85	1	98,82	49/50	0/35
F2 B	86	4	95,35	31/32	3/54
F2 C	89	2	97,75	46/48	0/41
F3 A	50	2	96,00	29/29	2/21
F3 B	48	2	95,83	28/28	2/20
F3 C	94	5	94,62	45/46	4/47
Σ	452	16	96,40	228/233	11/218



2,69 cM

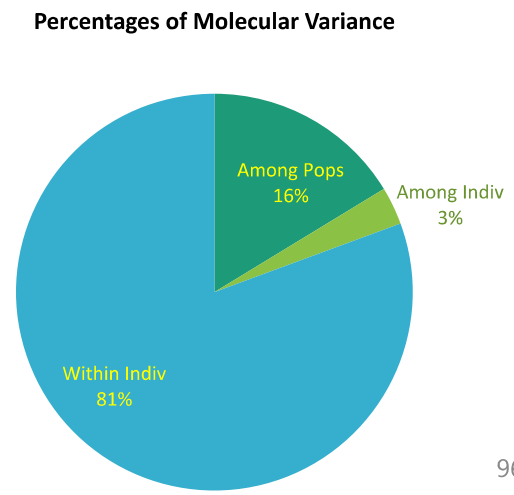
Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) mikroszatellit izolálási eredmények

Mikroszatellit dúsított parciális genomi könyvtár	4
Pozitív klónok száma (M13 PCR alapján)	144
Szekvenciák száma	138
Egyedi mikroszatellitek száma	125
<u>Új, működőképes mikroszatellitek száma</u>	<u>49</u>



FST: 0,163

Pop		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
magyar	Mean	21,327	3,592	2,123	0,839	0,489	0,465	0,476	0,018
	SE	0,155	0,193	0,113	0,052	0,042	0,027	0,027	0,056
holland	Mean	9,959	3,673	2,594	1,000	0,586	0,544	0,573	-0,062
	SE	0,029	0,205	0,144	0,061	0,044	0,029	0,030	0,052



Genom szekvenálás

ILLUMINA HighSeq 2000/2500

	Mate Pair1	Paired-End1	Mate Pair2	Paired-End2	összesen
Inszert méret(bp)	5000	350	8000	500	
Reads (db)	430 208 098	281 447 634	263 124 023	428 531 709	1 403 311 464
Read hossz (bp)	100	100	125	125	
Takarás	60X		60x		120x



Adat feldolgozás

- **Nemzeti Információs Infrastruktúra Fejlesztési (NIIF) Program**
- *Szekvencia minőség vizsgálat: Trimmomatic*
 - Az adatok 89% - a használható
- A szekvencia összeillesztése (De Novo Genome Assembly):
 - *SOAPdenovo*
 - *Allpaths-lg*
 - *Minia*



A szekvencia összeillesztések eredménye

	SOAPdenovo	Allpaths-lg	Minia
contigs	1 825 968	12 766	26 52 684
Largest contig	953317	545339	163814
Total length	1 162 594 395	939 385 245	698 425 129
GC(%)	38,37	38,23	37,99
N50	49 277	600 219	10 176
#N'sper100kbp	28 709,12	26 954,32	1 9473,97

- Az ivari markert megtalálható.
 - CgaY1 6Kb Contig



Clariidae és Siluroidei Uniprot szekvenciák genom illesztése

	Clariidae családból származó gének	Siluroidei alosztályból származó gének
Összes gén	722	15808
megtalált gén	518	11867
%	72	75
Azonosított gének hasonlósága 80% felett	55%	46%



Genom szekvenálás

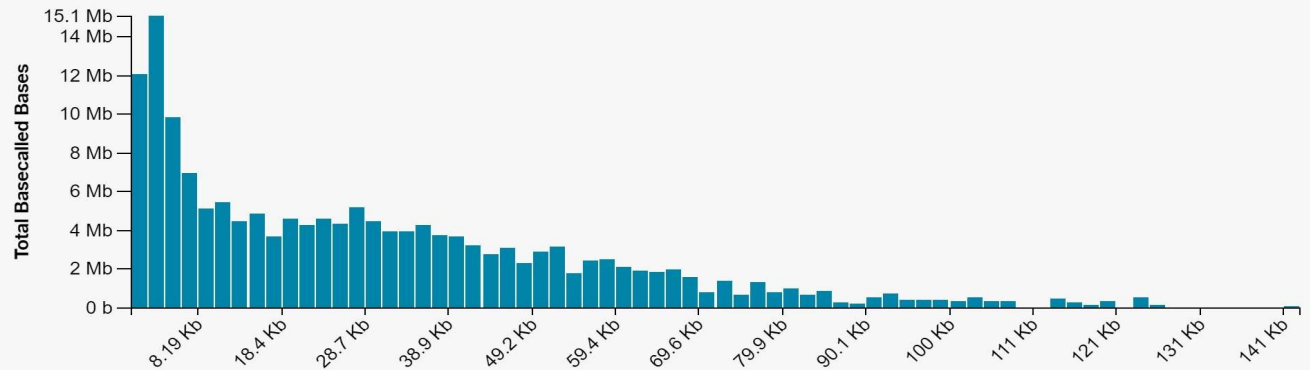


Oxford Nanopore Minion seq 3 flow cells

Read Length Histogram

Summary read length distribution

Estimated N50: 24.48 Kb



Nanopore genom

• scaffold-level:

• Total: 953347089
 Count: **2297**
 Average: 415040.09
 Median: 26463
 N00: 62792421
 N10: 46505944
 N20: 37814426
 N30: 35120585
 N40: 30524043
N50: 29889696bp
 N60: 26542925
 N70: 25048283
 N80: 22538315
 N90: 310833
 N100: 5006

scaffold-level top 28 scf:

Total: 837998939
 Count: **28**
 Average: 29928533.54
 Median: 28772725
 N00: 62792421
 N10: 46505944
 N20: 38087707
 N30: 36220668
 N40: 32951684
N50: 30422783bp
 N60: 28857692
 N70: 26542925
 N80: 25048283
 N90: 22538315
 N100: 16732452

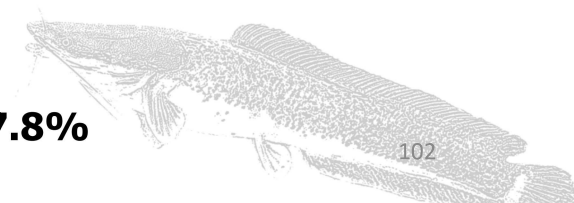
contig-level:

• Total: 945740421
 Count: 2585
 Average: 365857.03
 Median: 32754
 N00: 32317209
 N10: 17678523
 N20: 12688491
 N30: 10106318
 N40: 7692270
N50: 5096243bp
 N60: 4294652
 N70: 2934462
 N80: 1274335
 N90: 209906
 N100: 5006

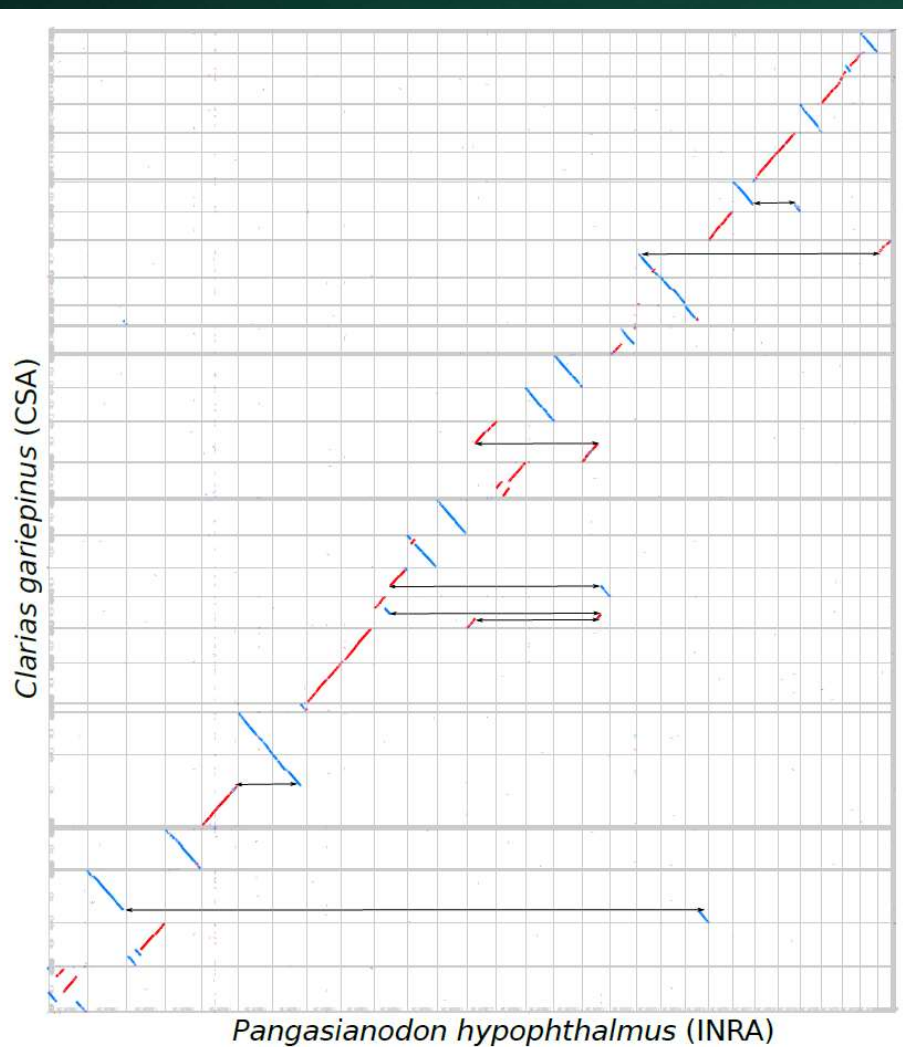
• contig-level top 28 scf:

Total: 830392771
 Count: 315
 Average: 2636167.53
 Median: 1020145
 N00: 32317209
 N10: 17707367
 N20: 12725114
 N30: 10993711
 N40: 9255743
N50: 6547273bp
 N60: 4776010
 N70: 3969713
 N80: 2741380
 N90: 1282371
 N100: 5106

Sequence assigned to top 28 scaffolds (chromosomes) = 87.8%

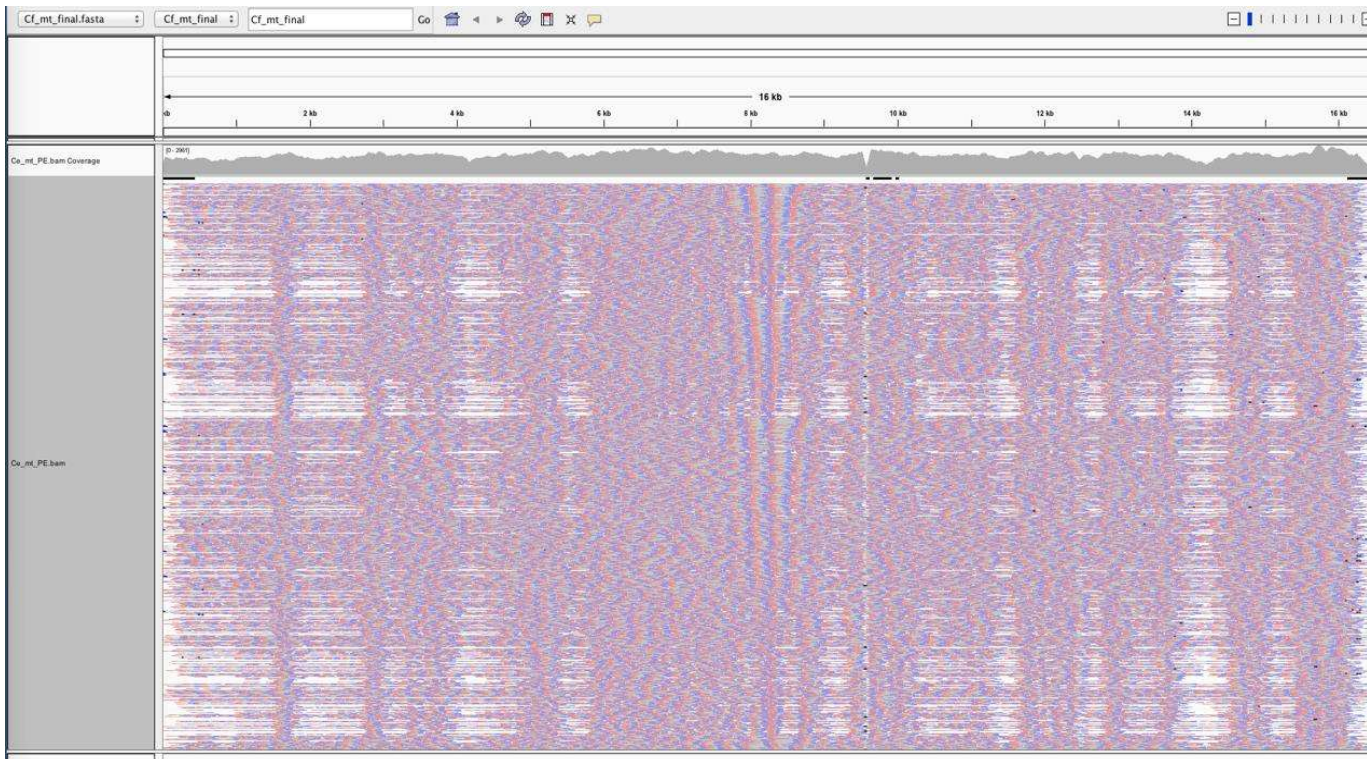


Nanopore genom



- Az ivari markert megtalálható
- CgaY1 89Kb Contig
- 1 gén van rajta
- Genom annotáció folyamatban

Mitokondriális genom Szekvencia Ilesztés



A mitokondriális DNS annotálása

- MITOS- szoftver
- 16 543 bp
 - 37 gén

Name	Start	Stop	Length	Strand
tRNA ^{Phe}	1	69	69	H
12S rRNA	70	1021	952	H
tRNA ^{Val}	1022	1093	72	H
16S rRNA	1094	2769	1676	H
tRNA ^{Leu}	2768	2842	75	H
ND1	2846	3811	966	H
tRNA ^{Ile}	3823	3894	72	H
tRNA ^{Gln}	3894	3964	71	L
tRNA ^{Met}	3964	4033	70	H
ND2	4034	5071	1038	H
tRNA ^{Trp}	5079	5149	71	H
tRNA ^{Ala}	5153	5221	69	L
tRNA ^{Asn}	5223	5295	73	L
tRNA ^{Cys}	5327	5393	67	L
tRNA ^{Tyr}	5405	5474	70	L
COX1	5482	7017	1536	H
tRNA ^{Ser}	7027	7097	71	L
tRNA ^{Asp}	7102	7174	73	H
COX2	7189	7872	684	H
tRNA ^{Lys}	7880	7953	74	H

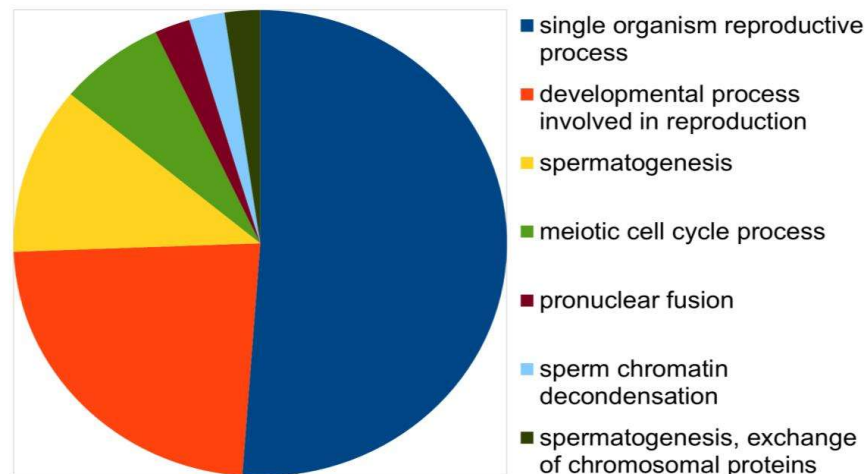
Name	Start	Stop	Length	Strand
ATP8	7955	8119	165	H
ATP6	8113	8793	681	H
COX3	8796	9578	783	H
tRNA ^{Gly}	9609	9681	73	H
ND3	9682	10029	348	H
tRNA ^{Arg}	10031	10099	69	H
NAD4L	10100	10393	294	H
NAD4	10390	11763	1374	H
tRNA ^{His}	11771	11840	70	H
tRNA ^{Ser}	11841	11906	66	H
tRNA ^{Leu}	11909	11981	73	H
NAD5	11991	13796	1806	H
NAD6	13808	14323	516	L
tRNA ^{Glu}	14324	14392	69	L
Cyt b	14394	15521	1128	H
tRNA ^{Thr}	15532	15604	73	H
tRNA ^{Pro}	15603	15672	70	L

Elővizsgálat: Transcriptoma szekvenálás

Kevert agy és gonád teljes RNS mintát szekvenáltunk 1-1 kifejlett tej és ikrás csoportosított mintákból.

Illumina HiSeq 2500 platformon 125 bp olvasás hosszal.

- Megközelítőleg 160 millió read
- 367,161 transzkript
- 311,187 géne
- 15,129 transzkript esetén mutatott 70%-ot meghaladó homológiát ismert génekkel.
- 572 gén expressziója mutatott erős ivari dimorfizmust



Tenyésztési programok

- Alacsony halliszt tartalmú táp hatékonyabb értékesítésére.
(iFishIENCi – Győri előre)
- Fejméret csökkentésére
(Feldolgozási veszteség csökkentése;
GINOP – V95 Nagyatád)
- Törzs körméret növelésére
(Filé méret növelés;
GINOP – V95Nagyatád)



MATE

MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet



MATE

MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet

Afrikai harcsa szelekciós tenyésztési
program az iFishIENCi projekt
keretében

iFishIENCI WP1.4

iFishIENCI: Intelligens haltenyésztés a releváns technológiák és a körkörös elvnek integrálásával

Célkitűzés:

Új intelligens takarmányozási technológiák biztosítása az európai akvakultúra-ipar ambiciózus, de fenntartható növekedésének támogatására.

- Alternatív takarmányok/ takarmányalkotók
- Alternatív genetikai vonalak létrehozása

Olyan afrikai harcsa vonal létrehozása, ami képes a nem „ideális” összetételű alacsony halliszt tartalmú táp hatékonyabb értékesítésére.



iFishIENCi WP1.4

Terv:

- Alga tartalmú táp
- Félüzemi méretek
- Termelési gyakorlatnak megfelelő nevelés

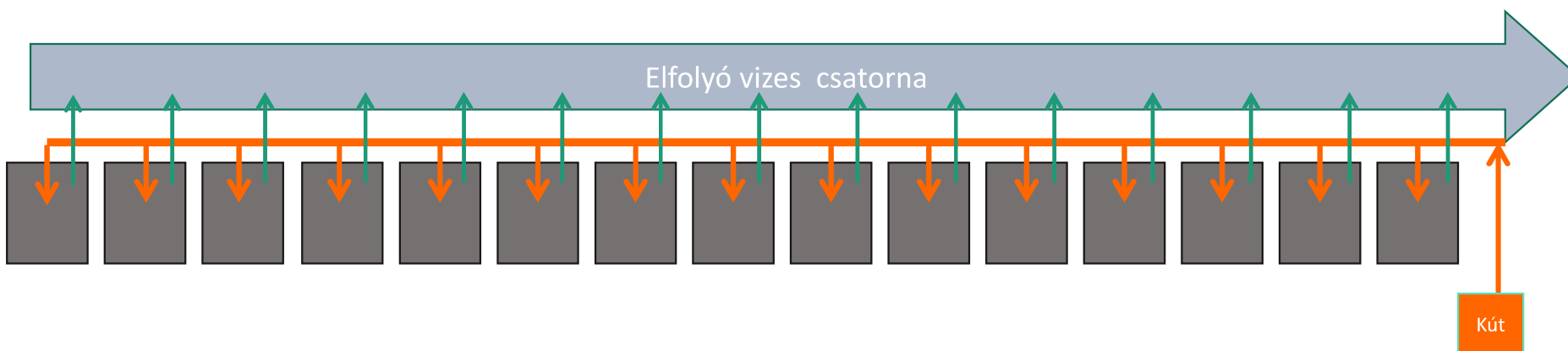
Gyakorlatban :

- kezdeti szelekció egy csökkentett halliszt tartalmú táppal
- Algalapú táp tesztelése
- Győri Előre Htsz. / Bajcshal



Haltartó rendszer

- Átfolyó vizes
- 15x 2m³ tartály
- Vízhőmérséklet 24-28 C°
- Kézi etetés a technológiának megfelelően
- Naponta többszöri vízcseré



Állomány

- Az anyaállományt a V95 Kft. biztosította
 - 5-6 telephelyről származó
 - Több korosztályba tartozó
 - Vegyes fenotípusú
 - „Széles genetikai háttérrel rendelkező”
 - Nem szelektált
- Anya kiválasztás ~1000db (2,5-8kg)
 - Fenotípus alapján (200db)
 - Szaporításra felhasznált (20 tejes/20 ikrás)



MATE
MAGYAR AGRÁR- ÉS
TUDOMÁNYI EGYETEM
kvakultúra és
örnyezetbiztonsági intézet

BAJCSHAL



Materials & methods I – Experimental feed

	Kísérleti táp	Kontroll táp
Halliszt(%)	6	8.1
Nyers fehérje(%)	42	42
Nyers Zsír(%)	12	12
Emészthető nyers fehérje (%)	29.5	28.4
Hamu (%)	5.6	6.6
Rost (%)	2.9	3
P (%)	1	0.9
(MJ)	20.2	20
Emészthető energia (MJ)	16.6	16.8

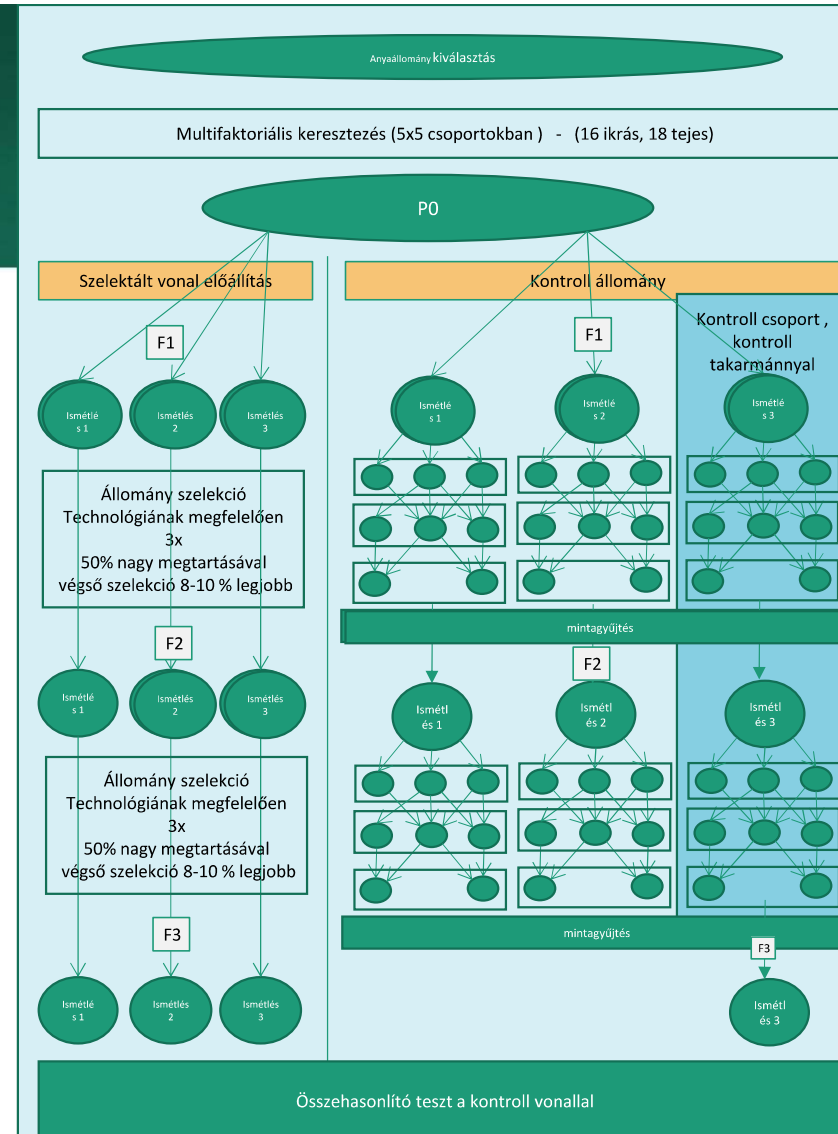


- Alacsonyabb halliszt tartalom
- Kereskedelemben elérhető

Keresztezések áttekintése



- Szelekció generációnként
- F1, F2, F3 és F4 utódokat 4 multifaktoriális keresztezéssel hoztak létre (5 hím x 5 nőstény mindegyik csoportból)
- Azonos mennyiségű ivartermék
- 3 párhuzamosan szelektált csoport az alacsony hallisztartalmú takarmányt legjobban értékesítő egyedekből.
- Jelenleg az F4 generációnál tartunk
- Eredmény tesztelése demonstrációs kísérletben

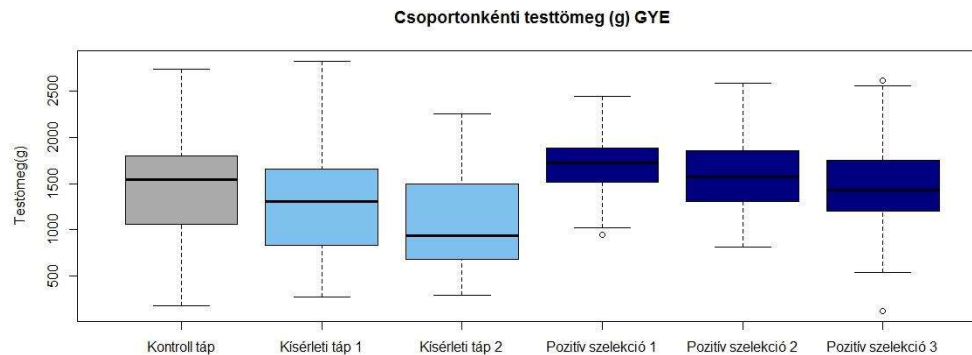


F1 generáció eredmények (N=1846)

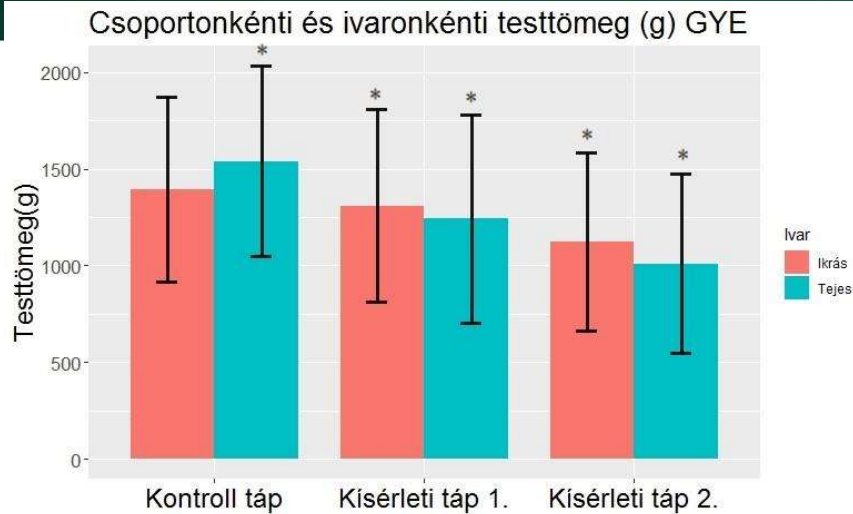
Az F1 generáció még nem szelektált

Testtömeg eloszlás az F1 generációban.

- Az alacsony halliszt tartalmú takarmánnyal etetett nem szelektált csoportok növekedési üteme alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban,
- A kísérleti táppal etetett legnagyobb egyedek csoportja hasonló eredményeket mutatott, mint a kontroll.



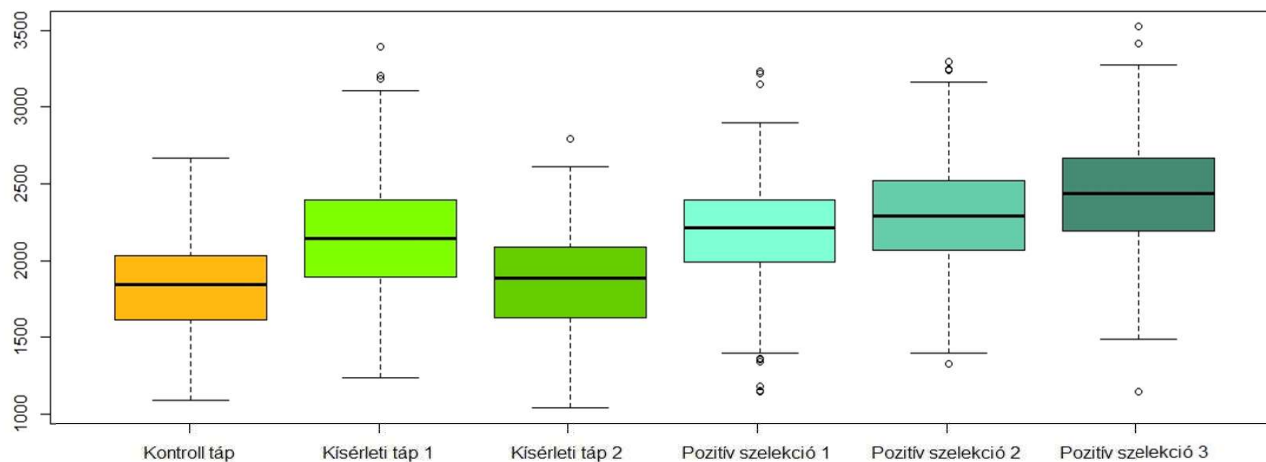
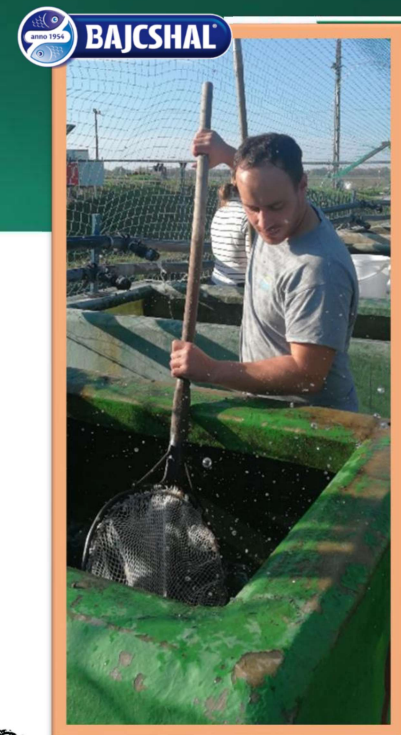
F1 generáció eredmények (N=1846)



Szignifikáns interakció volt megfigyelhető az ivar és a táp között.

Ez arra utal, hogy a különböző takarmányok hasznosítását befolyásolhatja az ivar (N=1846).

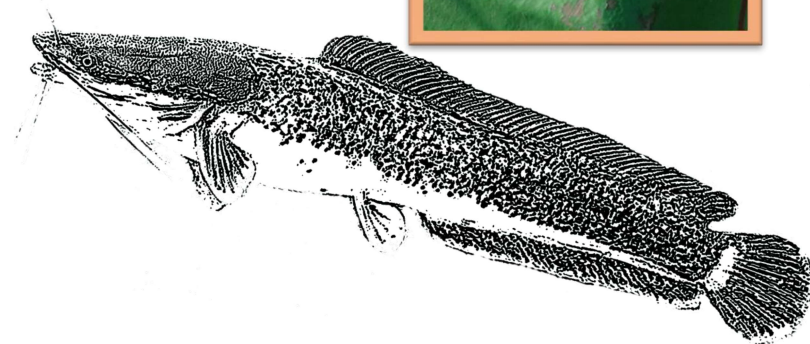
F2 generáció eredmények



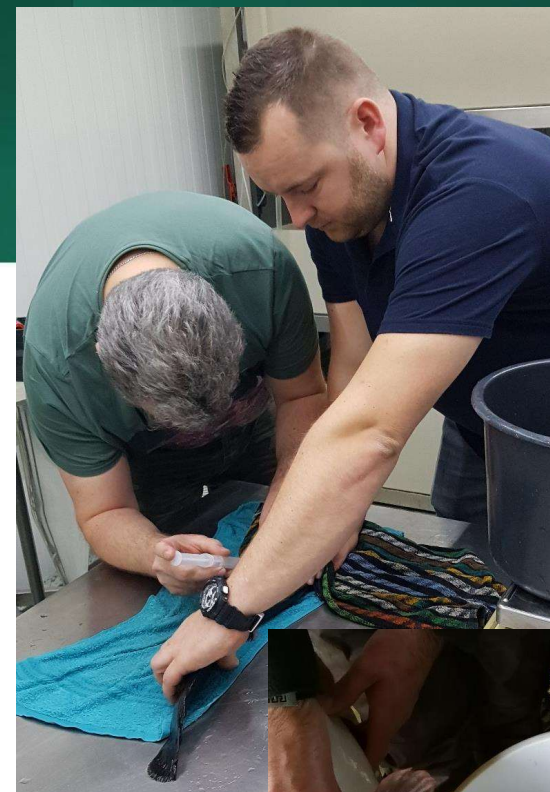
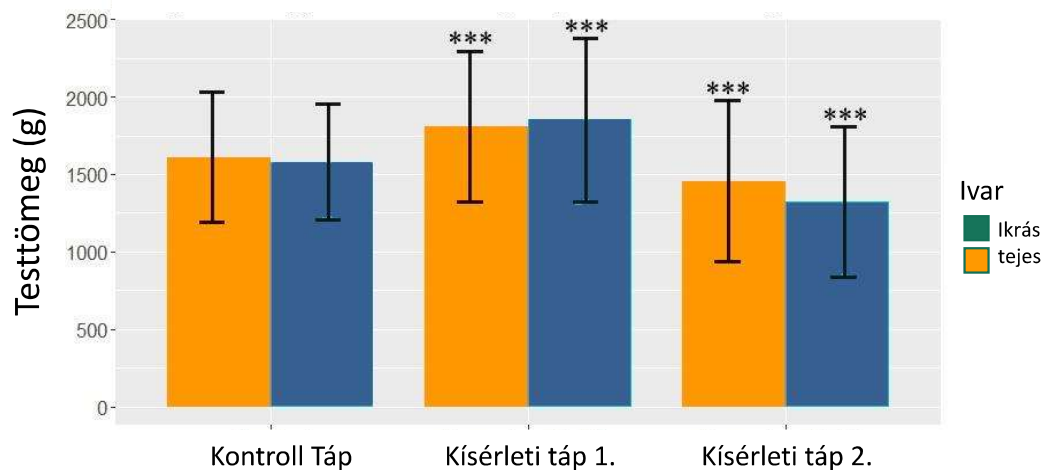
Testtömeg eloszlás az F2 generációban.

A szelekció jelentős hatással volt a növekedési rátára:

A szelektált vonalak legnagyobb egyedei szignifikáns mértékben gyorsabban növekednek a kontroll táppal, mint a kísérleti táp esetén. A számított különbség megközelítően 14%.



F2 generáció eredmények

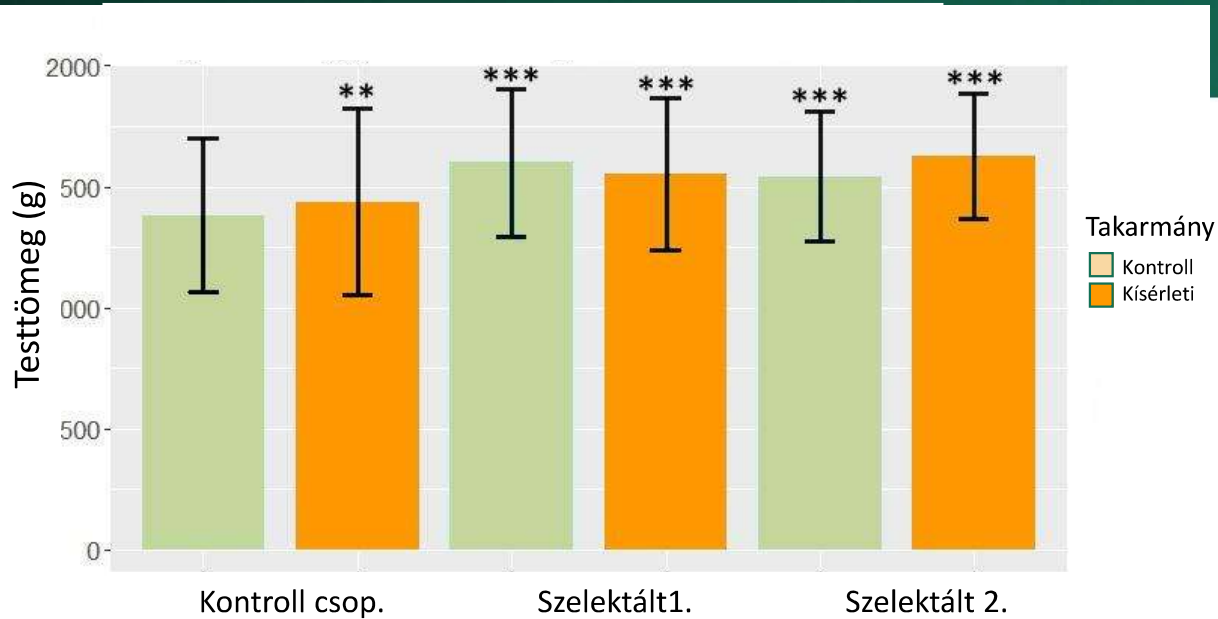


Ivar eloszlás az F2 generációban.

Nem volt megfigyelhető interakció az ivarok és a táp között.

Ez arra utal, hogy a különböző takarmányok hasznosítását befolyásolhatja az ivar.

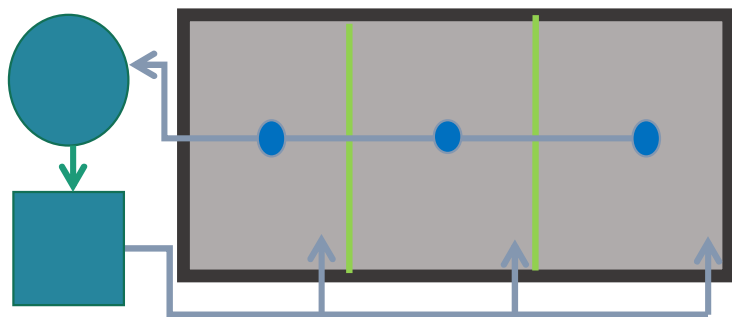
F3 generáció (n=3083)



- Nincs kimutatható takarmány-specifikus szelekciós hatás
- Minden szelektált csoport nagyobb a nem szelektált csoportoknál
- Sikeres szelekciós hatás a növekedési rátára (~11.97%)
- Az ivar és a takarmány között nincs kimutatható összefüggés



F3 generáció RAS rendszerben (n=267)

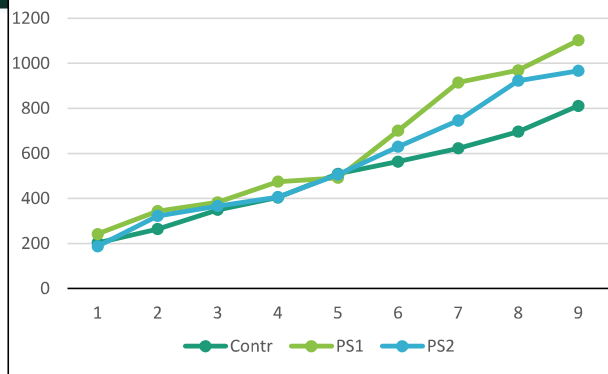


- Medence hatás kizárása
- Pit Tag jelölés
- Azonos számú egyed minden medencében
- 1 medence kontroll táp, 2 medence kísérleti táp
- 2 hetente végeztünk testtömeg méréseket

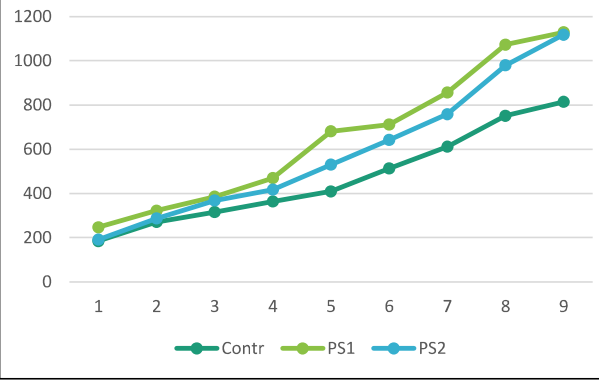


F3 generáció RAS rendszerben (n=220)

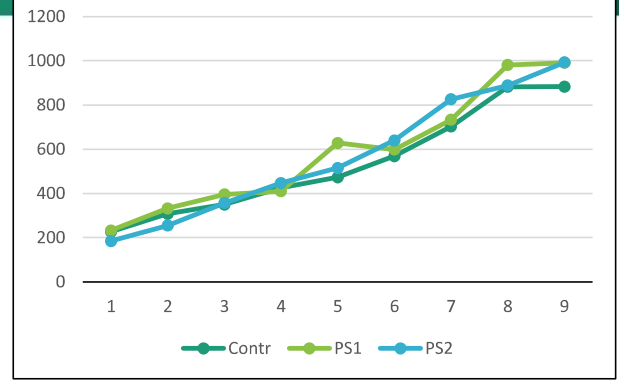
1-es medence / kísérleti táp



2-es medence / Kísérleti táp



3-as medence / kontroll táp



➤ A szelektációs nyereség:

- 12% a kontroll táp esetében
- 32% a kísérleti táp esetén

➤ Az is megfigyelhető volt, hogy a kísérleti tápot jobban hasznosították szelektált vonalak (~21%)

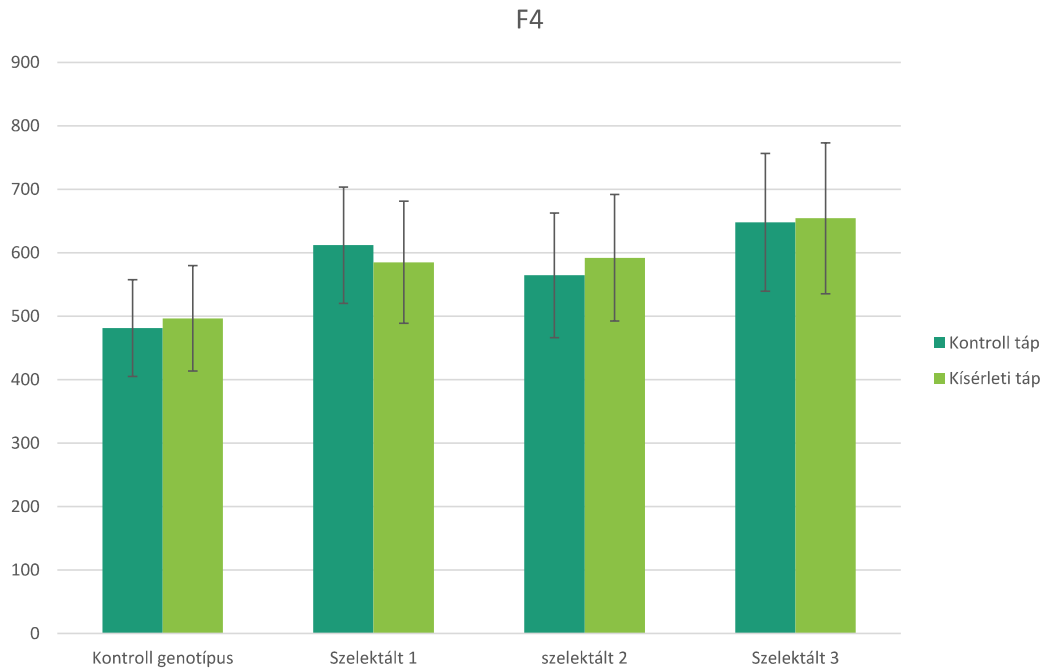


F4 generáció (n=8000)



Két demonstrációs kísérlet Magyarországon és egy Máltán (ABT).

1. teszt: a szelektált vonalak teljesítmény-vizsgálata



➤ 6 hét

➤ Kezdő átlag tömeg: $212 \pm 58\text{g}$

➤ Végő átlag tömeg: $555 \pm 80\text{g}$

➤ A szelektációs nyereség :

- 23% a kísérleti táp esetén
- 26% a kontroll táp esetében

➤ RAS rendszerben a szelektációs nyereség :

- 33% a kísérleti táp esetén
- 12% a kontroll táp esetében

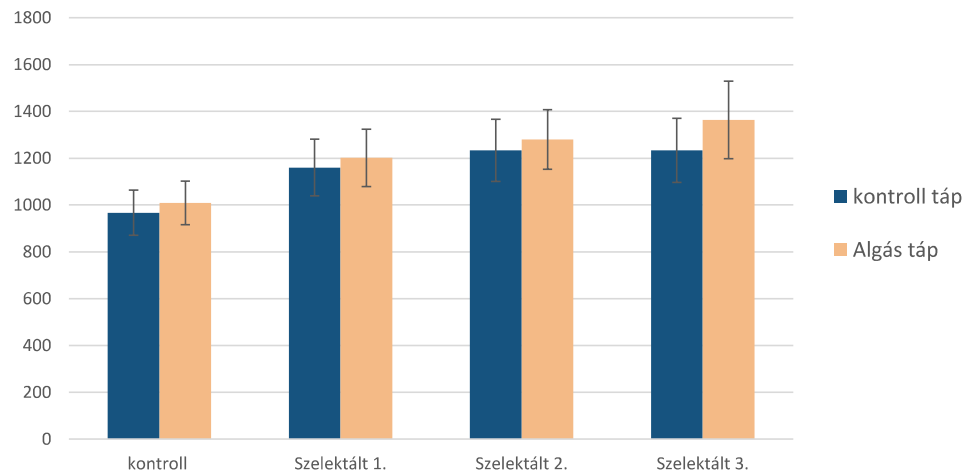
F4 generáció/ Alga (n=2400)

2. teszt: *Nannochloropsis* tartalmú alkalmazhatóságának vizsgálata a szelektált vonalakon

- Az alga lisztet iFishIENCi partner **NORCE** gyártotta
- Két „azonos nyers táplálóanyag tartalmú” táp (egyedi gyártás – Haltáp kft.) – 5% alga



F4 Algás táp



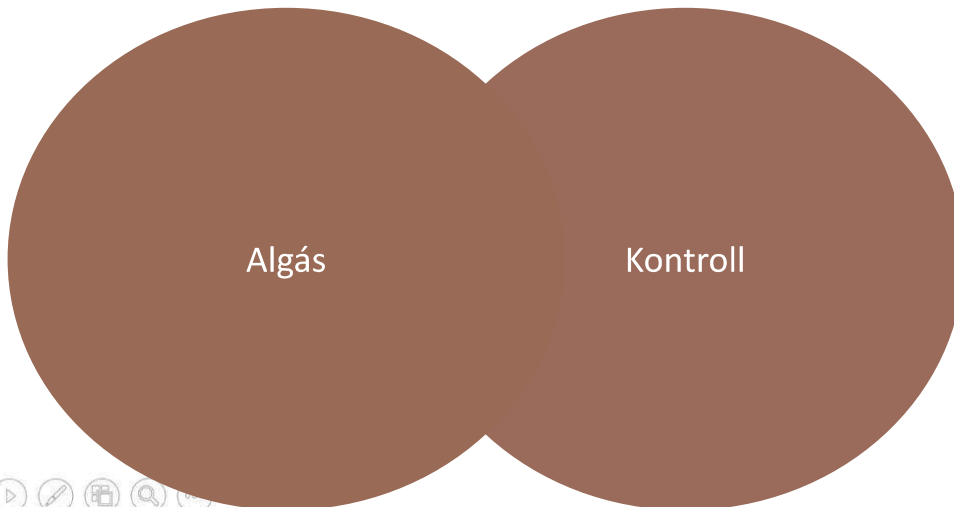
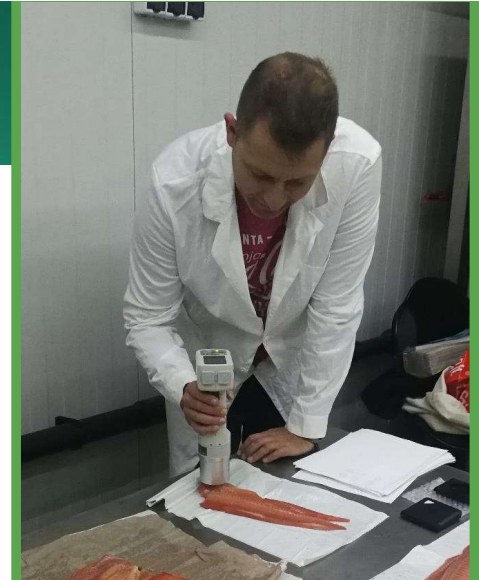
- 6 hét
- 300 egyed/csoport
- Kezdő átlag tömeg: $555 \pm 80\text{g}$
- Végső átlag tömeg: $1181 \pm 125\text{g}$
- Minden algás csoport nagyobb, mint a kontroll csoportja
 - (Átlagosan 5,3%)
- A szelekciós nyereség :
 - 19% a kísérleti táp esetén
 - 21% az algás táp esetében

F4 generáció/ Alga



➤ Szín hús szín.

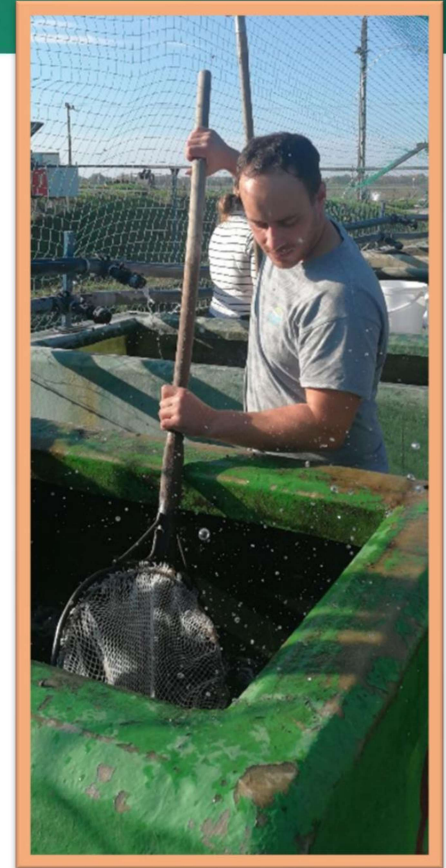
- Chroma Meter CR-400 - Konica Minolta
- 5 cm átmérőjű mérőfej
- 15 – 15 egyed / 3 ismétlés
- Cie LAB L*a*b* színrendszerben
- Előzetes eredmény
- ΔE^* : 2,19 (látható)



További tervek

- Hús beltartalom vizsgálata
 - Víztartalom
 - Fehérjetartalom
 - Hamutartalom
 - Összes zsír
 - Zsír savösszetétel (transz nélkül)
 - Szénhidrát tartalom
 - Energiatartalom
 - A-vitamin (all-transz retinol) tartalom
 - Béta-karotin (alfa és béta) tartalom

- Organoleptikus vizsgálat (Bajcshal)
 - folyamatban



További tervek

- F5 generáció létrehozása
- Fajtafenntartás / „Fajta bejelentés”
- Genetikai vizsgálatok (ddRAD) - folyamatban
- A növekedésben szerepet játszó gének expressziós vizsgálata - folyamatban
- Teljes transzkriptóma vizsgálat
- Szelekcióban használható markerek azonosítása



Összefoglalás

- Az általunk kialakított és alkalmazott **szelekciós rendszer** jól működött afrikai harcsán.
- Létrehoztunk egy **szelektált állományt**, amely a kísérletekben alkalmazott négyféle tápot hatékonyabban értékesítette, mint a kontroll vonal.
- RAS rendszerben a szelekciónál alkalmazott „**táp specifikus**” **szelekciós hatás** is megmutatkozott.
- Sikeresen teszteltük a *Nannochloropsis* **algát**, amely alkalmazása pozitívan hatott a növekedési rátára afrikai harcsában.
- Az algának nincs jelentős hatása az afrikai harcsa **hússzínére**.



