Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Molekuláris módszerek fejlesztése és alkalmazása közösségi és horgászati jelentőségű halfajok vizsgálatához

Doktori értekezés tézisei

Keszte Szilvia

Gödöllő

2022.

A doktori iskola megnevezése: Állatbiotechnológia és Állattudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztés-tudományok

Vezetője: Dr. Mézes Miklós

Intézet igazgató, az MTA rendes tagja

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem,

Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Kovács Balázs

Tudományos főmunkatárs

Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem

Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Molekuláris Ökológia Tanszék

……..	……
Az iskolavezető jóváhagyása	A témavezető jóváhagyása

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1.1. A munka előzményei

A világ népessége az 1990-es évek óta 5,3 milliárdról 7,9 milliárdra nőtt. A növekvő népességgel nőtt az emberek terület- és élelmiszer igénye is. Az ipar és a mezőgazdaság, hogy lépést tudjon tartani a növekvő igényekkel, egyre nagyobb területeket sajátított ki és vont be a termelésbe, emiatt napjainkra a nem megújuló erőforrások kimerülni látszanak. Ennek a kedvezőtlen folyamatnak az eredményei jelenleg már szinte mindenki számára ismertek. A globális CO_2 és más üvegházhatású gázok kibocsátásának növekedése, a többek között ebből is fakadó klímaváltozás, a fajok kipusztulása, és a biodiverzitás csökkenése már senki előtt nem ismeretlen fogalmak. A környezetvédelmi mozgalmak mellett a nagy világszervezetek is igyekeztek nyomon követni a változást (lásd: Biodiverzitási fórum, Rio de Janeiro, 1993; Konferencia a globális felmelegedésről, Hága, 2000; ENSZ Világcsúcs konferencia a fenntartható fejlődésről, Johannesburg, 2002, stb.) és különböző környezetvédelmi stratégiákat, akcióterveket dolgoztak ki a biodiverzitás megőrzése érdekében.

A fenntartható halászat a globális GDP-hez évente 0,1%-kal járul hozzá. Az elmaradottabb országokban, ahol a halászati tevékenység létfontosságú, ez az érték magasabb is lehet. 2020. február 14-én aláírásra került egy globális egyezmény az illegális halászat ellen, mellyel csökkenteni szeretnék a drasztikus túlhalászást, ami hozzájárul vizeink ökológiai állapotának romlásához. Jelenleg a halászat mértéke a halászati területek több mint egyharmadán meghaladja a fenntartható szintet. Ahhoz, hogy megfelelően tudjunk gazdálkodni erőforrásainkkal úgy, hogy közben segítsük a biodiverzitás megőrzését, elengedhetetlen annak minden aspektusát ismerni, beleértve a genetikai diverzitást is. Hazánk természetesvízi halpopulációiról, pláne a gazdasági jelentőséggel tradicionálisan nem, vagy kis mértékben rendelkező fajok genetikai hátteréről még igen keveset tudunk, holott az elmúlt évtizedekben itthon is számos olyan eseménynek lehettünk tanúi, melyek drasztikus hatással bírtak a halfaunára. Gondoljunk csak a tiszai cianid szennyezésre, vagy a Marcalt érintő vörösiszap katasztrófára. A molekuláris módszerek fejlődésével és a genetikai markerek megjelenésével kezünkbe kerültek a megfelelő eszközök a hazai halpopulációk genetikai diverzitásának felmérésére, filogenetikai vizsgálatára, ezzel feltérképezve az állományok aktuális állapotát, és a múltbéli események hatásait az egyes populációkra. Ezek a vizsgálatok kiemelten fontosak az idők során lecsökkent méretű populációkkal rendelkező őshonos, és közösségi jelentőségű fajok, mint, a kevéssé kutatott kősüllő (*Sander volgensis*), a megfogyatkozott balatoni garda (*Pelecus cultratus*) populáció, valamint az egyre több teret nyerő és értékes őshonos, bennszülött fajainkat kiszorító invazív fajok, mint az ezüstkárász (*Carasius spp.)* esetében is.

Az utóbbi évtizedek bebizonyították, hogy mind valami ellen (például az algavirágzás megfékezésére betelepített, majd kontrollálhatatlanná vált busa-fajok), mind valami érdekében (pl. gazdasági hasznot remélve a törpeharcsák telepítése vizeinkbe) beleavatkozni a természetes rendszerbe csak felelős döntések és kellő háttérismeret mellett lehetséges. Ehhez járulnak hozzá a biodiverzitás fenntartását és genetikai erőforrásaink megőrzését célzó molekuláris genetikai kutatások.

1.2 Célkitűzések

1. Mikroszatellit markerek adaptálása populációgenetikai vizsgálatokhoz közeli rokon fajokból az őshonos kősüllő (*Sander volgensis*), valamint a közösségi jelentőségű garda (*Pelecus cultratus*) esetén.

2. Mitokondriális genomi markerek (Citokróm *b*, Kontroll régió, Citokróm oxidáz 1) alkalmazhatóságának felmérése filogenetikai és taxonómiai vizsgálatokhoz az invazív ezüstkárász (*Carassius gibelio*) esetében.

3. A Balaton és vízgyűjtő területein található idegenhonos, invazív ezüstkárász populációk genetikai diverzitásának vizsgálata.

4. Magyarország nagyobb vizeiben található őshonos kősüllő populáció genetikai diverzitás vizsgálata.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Mintavétel és DNS izolálás

A mintavételezés során a vizsgált 3 halfaj (garda, kősüllő, ezüstkárász) minden egyedétől egy 1-2 cm2 nagyságú szövet darab került begyűjtésre a farokúszóból. A kősüllő esetén a 118 minta 3 populációból lett begyűjtve. A Balatonból 72 db minta, a Dunából 34 db minta, a Tisza és Holt-Körös egységből pedig 12 db mintánk van. A garda esetén a 128 minta a Balatonból (n=54), a Fertőből (n=23) és a lengyel Visztula-lagúnából származnak. Az ezüstkárász esetén pedig 132 minta került felhasználásra, melyből 29 db Siófok környékéről, 17 db a kányavári, 18 db az ingói, 19 db az Őszödi-berek, 19 db a Siófok-töreki tavak régióból származik, 30 db pedig a hőgyészi horgásztóból. Az állatokat minden esetben 2-fenoxietanollal altattam a szövetek begyűjtése előtt. A mintavételezés után a szövetdarabok abszolút etanolt tartalmazó 1,5 ml-es centrifugacsövekbe kerültek, majd további felhasználásig -20 C°-on tároltam őket. A DNS izolálás E.Z.N.A szöveti DNS izoláló kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) használatával történt a gyártó protokollja alapján.

2.2. Mikroszatellit vizsgálatok

Az 50 ng/µl töménységű DNS-ből a vizsgálni kívánt szakaszt polimeráz láncreakcióval (PCR) szaporítottam fel. A kősüllő esetén alkalmazott mikroszatellit markerek (Kohlmann & Kersten, 2008; Kánainé et al., 2019a) süllő (*Sander lucioperca*) fajból származtak. Az alkalmazott primerek fluoreszcensen jelölt oligonukleotidok voltak. Mindegyik primer egy 17 bázis hosszú (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') univerzális meghosszabbítást (farkat (tail)) hordozott. Ez komplementer egy harmadik fluoreszcens 5' végen jelölt primerrel. A reakcióhoz hozzáadva a fluoreszcens primer, a farokkal ellátott forwarddal és a reverssel együtt beépül a felsokszorozódott amplikonba (Shuelke 2000).

A PCR protokoll optimalizálása során vagy a PCR összetevőit (10X-es $(NH4)_2SO4$, $MgCl_2$, dNTP (2,5 mM), oligonukleotid primerek (6,6 uM), Taq (5U/ µl)) vagy a reakció hőprofilját változtattuk (feltapadási hőmérséklet, ciklusszám). A kősüllő esetén az alkalmazott protokoll egy két lépcsős PCR protokoll volt. Az első ciklusonkénti ismétlések száma mindegyik marker (MSL-1, MS 701, MS 704, MS 404, MS 395) esetén 2 db volt. A második lépcsőben a ciklusszám az MSL-1 marker esetén 25, az MS 701, MS 704, MS 404, MS 395 esetén pedig 45 ciklus volt. A garda esetén a PCR során nem volt szükség 2. lépcsőre. A 40 ciklusos felsokszorozás során a feltapadási hőmérséklet 56 C° volt.

A PCR protokollok optimalizálása után a következő lépés a kapilláris elektroforézis volt. A minta-előkészítés során a PCR termékekhez hozzámértem a 0,1 µl molekulasúly markert (GeneScan 500 LIZ (Applied biosystems USA)), és a 9,9 µl Hi-Di formamidot. A kapilláris gélelektroforézishez szükséges reakció elegyet minden esetben 10 µl végtérfogatban mértem össze. A kihígított terméket a kapilláris gélelektroforézis előtt 94 °C-on 6 percig denaturáltam ProFlex PCR készülékben (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok). A kapilláris gélelektroforézist NanoPOP7 (Applied Biosystem, USA) polimer használatával, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetében található 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA) készülékén végeztem el 50 cm hosszú kapillárison keresztül.

2.3. Mitokondriális vizsgálatok

A mitokondriális genom vizsgálatakor, a PCR során mindhárom faj (kősüllő, ezüstkárász, garda) és mindhárom alkalmazott marker (D-loop, Citokróm *b*, Citokróm oxidáz 1) esetén azonos, 25 µl végtérfogatú reakció elegyet használtam, ami 1×$(NH_4)_2SO_4$ pufferből (Fermentas; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2000 µM dNTP mixből, 250 nM primer, 1.5 mM $MgCl_2$ és 100 ng templát DNS-ből, valamint 1 U Taq polimeráz enzimből (Fermentas) állt. A PCR tisztítást a Sigma Aldrich gyártó (Merck, Darmstadt, Németország) GenElute PCR tisztító kitjével végeztem el, a gyártó protokollja alapján.

A szekvencia leolvasáshoz a fölösleges reakció összetevőktől megtisztított PCR termékeket három lépésben készítettem elő. Első lépésként a mintákat ismét megfuttattam 1,5 %-os agaróz gélen, hogy ellenőrizzem a tisztítási lépések sikerességét és a termékek erősségét, majd a tisztított PCR terméken egy szekvenáló PCR-t végeztem BigDye Terminator V3.1 szekvenáló kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével. A szekvenáló reakció 10 µl végtérfogatban került összemérésre, melybe a tisztított PCR terméken felül 2 µl BigDye, 2,5 µl 1X-es BigDye puffer és 2 µl 6,6, µm-os primer került. A szekvenáló reakciókat mindhárom faj minden mintája esetén reverz és forward irányból is elvégeztem. A szekvenáló PCR-t egy alkohol lépcsős kicsapás követte. A precipitációs keverék pontos összetétele: 3 µl Nátrium-acetát (3M), 14,5 µl MQ tisztaságú víz, 62,5 µl cc. etanol. A mintákat ezt követően steril fülke alatt kiszárítottam, eltávolítva ezzel a maradék alkoholt is a szövetek felületéről, majd mintánként 20 µl HiDi formamidban feloldottam őket és minimum egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltam. Az inkubációt követően a szekvenáló gépbe helyezés előtt 94 °C-on 6 percig denaturáltam.

A bázispár meghatározás az első minták esetén, a 2019 előtt a kapilláris gélelektroforézisekhez is alkalmazott 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, USA) készüléken négy 50 cm-es kapillárissal, majd egy újabb típusú 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosytem, USA) készüléken zajlott nyolc 50 cm-es kapillárison keresztül.

2.4. Az adatok elemzése populáció genetikai szoftverekkel

A mikroszatellit markerek esetén a Genetic Analyzer készülék által leolvasott nyers adatokat a GENEMAPPER SOFTWARE VER. 4.0 (Applied Biosystem) segítségével jelenítettem meg, majd a kapott görbéket értékelve az allélméreteket EXCEL (Microsoft) táblázatban rögzítettem. Az alléladatok alapján a GENALEX VER 6.5. (Peakall & Smouse, 2012) és a GENEPOP VER. 4.7. (Rousset, 2008) szoftverekkel végeztük el a populációgenetikai számításokat. A populációk szerkezetét jellemző klaszter számokat a STRUCTURE VER 2.3.4 (Earl & vonHoldt, 2012) szoftverrel határoztam meg, eredményeit a STRUCTURE HARVESTER program alapján értékeltem (Evanno et al., 2005). A főkomponensekre végzett diszkriminancia analízist (DAPC) az R 4.1.0 szoftver „adagenet" programcsomagjával készítettem el (Jombart, 2008).

A mitokondriális markerek esetén a nyers szekvencia adatokat a MEGA X szoftverbe (Kumar et al., 2018) importáltam. A kromatogramok leolvasása után a szekvenciákat trimmeltem és a Mega szoftverben a CLUSTALW (Higgins & Sharp, 1988) programmal illesztettem, majd az illesztést a DNASP6 (Rozas & Rozas, 1995)

szoftverbe importáltam FASTA formátumban és végeztem el a populációgenetikai számításokat. A polimorf bázishelyek alapján azonosított haplotípusokat az NCBI (National Center for Biotechnology Information), BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) programjával ellenőriztem (Altschul et al., 1990), illetve a citokróm oxidáz 1. esetében a BOLD (Barcode of Life Data System) online elérhető (https://www.boldsystems.org/) programmal. A filogenetikai törzsfákat szintén a MEGA X-el, a haplotípusok közötti rokonsági kapcsolatokat bemutató hálózati ábrát pedig a PopART szoftverrel (Bandelt et al., 1999; Clement et al., 2002) median-joining hálóval készítettem el.

3. EREDMÉNYEK ÉS AZOK MEGBESZÉLÉSE

3.1. A kősüllő

3.1.1 A kősüllőn végzett mikroszatellit marker vizsgálatok

A kősüllő esetén a vizsgálatokhoz 13 a fogassüllő fajban leírt marker (MS 420, MS 417, MS 192, MS 384, MS 373, MS 703, MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSL-1) került kiválasztásra. A PCR optimalizálás során elsősorban a $MgCl_2$ mennyiségét, a feltapadási hőmérsékleteket és a ciklusszámokat változtattam meg, hogy megteremtsem az ideális reakció körülményeket. Két marker esetén (MS 423, MS 424) a protokoll többszöri változtatásával sem sikerült terméket felszaporítani. Hat marker (MS 420, MS 417, MS 192, MS 384, MS 373, MS 703) pedig a kapilláris gélelektroforézis alapján monomorfnak bizonyult, vagy csak maximum kétféle allélmérettel rendelkezett. Az MS 420-as marker esetében ezek 161 és 171-es allél méretek, az MS 417-nél 266, az MS 192-nél 223, az MS 384-nél 266, az MS 373 esetében 180 és 190, az MS 703 markernél pedig kizárólag 170 bp hosszúságú allélokat detektáltam. Végül a Kánainé-féle süllő markerek (Kánainé et al., 2019a) közül 4 markerrel (MS 701, MS 704, MS 404, MS 395), illetve a mellé választott szakirodalomból szintén süllőre leírt és átemelt MSL-1 (Kohlmann & Kersten, 2008) markerrel végeztem el a mikroszatellit elemzést, bizonyítva a markerek fajok közötti adaptálhatóságát.

A vizsgált 3 populációban (Balaton, Duna, Tisza és Holt-Körös együttes) a legtöbb allélt (n=11) az MS 704-es és az MS 395-ös markerrel tudtam kimutatni. A markerenként legnagyobb frekvenciával rendelkező allélméretek 3 esetben is (MS 701, MS 704, MS 395) meghaladják, vagy megközelítik az 50 %-ot. Egy mikroszatellit marker alkalmazhatóságának vizsgálatakor az ilyen magas allél frekvencia nem feltétlenül jelent jót. Ha több allélméret van, és változatosabb a megoszlásuk, a marker polimorfitása is magasabb. A PIC (polimorf információ tartalom) értékek alapján az általam alkalmazott markerek mindegyike a rendkívül informatív kategóriába esett, ha a populációkat összességében nézzük. Az MS 701-es PIC értéke, akár csak az MS 704-esé 0,63. Az MS 404-esé 0,76, az MS 395-ösé 0,71, az MSL-1-esé pedig 0,77. Ha a populációkra lebontva nézzük mindhárom populáció esetében volt olyan marker, ami az adott populációban csak mérsékelten informatívnak bizonyult. Ezek a Balaton esetében az MS 701, a Tisza és Holt-Körös együttes esetében az MS 704 és MS404, a Duna esetében pedig az MS 404 és MS 395.

A vizsgált kősüllők esetében az összes egyedre nézve markerenkénti bontásban elmondható, hogy egyik marker esetén sem tapasztaltam szignifikáns eltérést a Hardy-

Weinberg egyensúlytól. Külön-külön vizsgálva viszont a 3 kősüllő populációt több esetben is eltérést tapasztaltam az ideális állapottól. Csak az alacsony mintaszámú Tisza_Holt-Körös populáció esetében fordult elő nem szignifikáns eltérés a 701-es és a 395-ös markere esetén. Mind a Balatonban, mind a Dunában heterozigóta hiány figyelhető meg. Az F_{is} érték, mely a populációkon belüli differenciáltságot méri a Balaton esetén 0,403, a Tisza_Holt-Körös csoport esetén 0,351, a dunai kősüllő minták esetén pedig 0,447 volt. Az adatok alapján a három kősüllő populáció közül a Tisza_Holt-Körös tűnt a legváltozatosabbnak az egyedek szintjén. A koefficiens mindhárom populáció esetén pozitív értéket vett fel, ami alátámasztja a Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés szignifikancia tesztjén kapott eredményeket és a heterozigóta hiányt. A Structure elemzés a 3 mintavételi helyről összes vizsgált egyed esetén 2 klaszter elkülönülését tartotta a legvalószínűbbnek 12 futásból az Evanno módszer alapján (Evanno et al., 2005).

3.1.2. A kősüllőn végzett mitokondriális marker vizsgálatok

A három kősüllő populáció (Balaton, Tisza-Holt-Körös, Duna) mitokondriális genomjának vizsgálatakor az ún. kontroll régiót, azaz D-loop régiót vizsgáltam. Az elemzést 68 balatoni, 10 Tisza_Holt-Körös egységi és 34 dunai mintán végeztem el. A PCR-ek mindegyik mintán sikeresnek bizonyultak. A szekvenálás utáni illesztést követően mintánként 849 bázispár hosszúságú szekvencia állt rendelkezésemre a vizsgálatokhoz. A vizsgált 849 bázisból 8 bázis volt polimorf, és mind a 8 a parszimónia számára informatív helynek bizonyult.

A haplotípus diverzitás értéke a 3 populációra együttesen nézve (Hd): 0,6049, míg a nukleotid diverzitás értéke (π): 0,001. Ha külön-külön nézzük az egyes populációkat a balatoni populáció nukleotid diverzitási mutatói (π: 0,001 és Hd:0,65) hasonló értéket vettek fel a három populáció együttes értékeivel. A Tisza és Holt-Körös együttese esetén π:0,0006, Hd:0,53, míg a Duna esetén π:0,005 és Hd:0,43. Összesen 7 haplotípust tudtam elkülöníteni. A balatonból mindegyik haplotípusba kerültek egyedek. A dunai populációban 3 és a tisza-holt-körösi egység esetében 2 haplotípust találtam. A leggyakoribb 1-es haplotípust (Hap_1) 64 kősüllő egyed hordozta, köztük vegyesen találhatóak mindhárom populációból (Balaton-Bal, Tisza_Holt-Körös-THK, Duna-Du) minták. A Hap_1 haplotípuson kívül, a Hap_2 volt a másik, mely mindegyik populációban jelen volt. Ez az alacsony szintű mitokondriális diverzifikáltság összefügghet a korábbi mikroszatellit vizsgálatokban mért magas heterozigótahiánnyal, ahol a populációkon belüli egyedek közötti differenciáltság mérőszáma (Fis) a Tisza-Holt-körös egység esetén mutatta a legkisebb változatosságot.

A legnagyobb genetikai távolság (Fs: 0,001137) a Tisza_Holt-Körös és a balatoni populáció között figyelhető meg. A Balaton esetén negatív Fu-féle Fs érték (-0,89) növekvő populáció méretre utal, ezt támasztja alá, a Tajima féle -0,67-es D érték is. Országos szinten a FAO statisztika is hasonló adatokat mutat, ahol a mintázási időszakban (2016 és 2017) az országos fogás 11 t-élősúlyról 13 tonnára emelkedett. Bár ez bíztató eredmény, a mennyiség még mindig csekély a 2015-ös évben rögzített 18 tonnás adathoz képest (FAO, 2019). Az NCBI adatbázisaiban végzett szekvencia ellenőrzés a nukleotid BLAST elemzéssel alátámasztotta az egyedek morfológiai jegyek által történt azonosítását.

3.2 Az ezüstkárász

3.2.1. Az ezüstkárász D-loop régiójának vizsgálata

Az ezüstkárász esetében a 6 mintavételi helyről (Siófok (n=29), Ingó (n=18), Kányavár (n=17), Hőgyész (n=30), Siófok-Töreki tavak (n=19), Őszödi-berek (n=19)) összesen 132 egyed mitokondriális D-loop, azaz kontroll régióját vizsgáltam meg. A 43 polimorf bázis hely alapján a 132 szekvenciából 22 haplotípust tudtam meghatározni. A 22 szekvencia változatból 9 olyan haplotípus van, mely mindössze egy egyedben és 7, ami csak két mintában fordul elő, szemben a leggyakoribb 1-es haplotípussal (HapDl_1), ami 46 egyedben van jelen. A harmadik legnagyobb egyedszámmal bíró haplotípus, a 21-es (HapDl_21) csak az Őszödi-berek mintáiban fordult elő. Ez a populáció az egyetlen, ami két teljesen elkülönült haplotípusra oszlik csupán, melyek a HapDl_21 17 db és a HapDl_22-es haplotípus 2 mintával. A legtöbb, összesen 9 haplotípust a Siófoknál, a Balatonból mintázott populáció hordozta.

A legmagasabb haplotípus diverzitási értéket (Hd:0,83) a Siófokon mintázott egyedek mutatták, míg nukleotid diverzitás esetében a Siófok-Töreki tavak ezüstkárász populációja, ahol π: 0,13. Bár a Siófok-Töreki minták csak 4 haplotípusba sorolódtak, ezért is az alacsony haplotípus diverzitási szám, de két egyed is a 4-es haplotípusba (HapDl_4) került. Ez a szekvencia változat tartalmazta a legtöbb polimorf bázist a többi haplotípushoz viszonyítva.

A taxonómiai besorolás egyik támpontja az NCBI GenBank-ban elérhető nukleotid adatbázis összehasonlító szekvencia vizsgálat (BLAST) volt. A kapott ezüstkárász haplotípusok standard nukleotid BLAST elemzése során 7 haplotípus (HapDl_3, HapDl_4, HapDl_6, HapDl_8, HapDl_11, HapDl_13, HapDl_14) szekvenciája a 22-ből nagyobb hasonlóságot mutatott a kárász komplex más tagjaival, mint az ezüstkárásszal. Az illesztések alapján a HapDl_3, HapDl_6, HapDl_8, HapDl_11, HapDl_13 és HapDl_14 mind a *Carassius auratus auratus*-t, vagyis az aranyhalat takarja, a HapDl_4, pedig a *Carassius auratus buergerit*, ami az aranyhal egy japán alfaja. A saját haplotípus szekvenciáink taxonómiai besorolásának megerősítése érdekében, valamint a kontroll régió taxonómiai elkülönítésre alkalmas markerként való működésének ellenőrzésére, az egyes D-loop haplotípusokat hordozó szekvenciákat megvizsgáltuk a mitokondriális genom Citokróm *b* (Cyt.B.) és Citokróm oxidáz 1-es alegységére (Co.I.) is.

3.2.2. Az ezüstkárász Citokróm b régiójának vizsgálata

A Citokróm *b* vizsgálat során a DnaSP6 szoftver a korábbi kontroll régió alapján meghatározott 22 haplotípus referencia egyedeiből a nukleotid diverzitás alapján mindössze 6 haplotípust azonosított.

A HapDl_4-es, HapDl_6-os és HapDl_11-es D-loop haplotípust, amiket a korábbi BLAST elemzés a *Carassius auratus auratus* és *Carassius auratus buergeri* szekvenciákkal azonosított, a mitokondriális genom Citokróm *b* régiójában mutatott nukleotid diverzitásuk alapján itt is külön csoportba kerültek. A szintén eltérő HapDl_8-as, HapDl_3-as és HapDl_14-es haplotípus beolvadt a leggyakoribb citokróm *b* csoportba a HapCb_1-esbe. A citokróm b csoportok BLAST elemzése jóval egységesebb képet mutatott. Mindegyik szekvencia *Carassius gibelio* szekvenciákkal került egy besorolásba, ráadásul szemben a D-loop értékkel a legtöbb esetben mind a query, mind az identity értéknél 100%-os egyezéssel.

3.2.3. Az ezüstkárász Citokróm oxidáz 1 vizsgálata

A mitokondriális genom 3 régiójából a Co.I. marker mutatta ki a legkevesebb, mindössze 4 haplotípus csoportot. A 4 Co.I. csoport BLAST analízisének eredménye felhívja a figyelmet az online adatbázisok korlátaira, és a feltöltött adatok kritikus kezelésére. Az NCBI BLAST standard nukleotid elemzése 2 haplotípust is (Co.I._1, Co.I._3) *Carassius auratusként* azonosított. A citokróm oxidáz 1 régiót bárkód-régiónak is nevezik. A szekvencia alapján végezhető keresésre egy külön adatbázist is létrehoztak. A BOLD (The Barcode of Life Data System) rendszerben (web) szintén lehet a szekvenciák FASTA formátumú illesztése alapján azonosságokat keresni. Az eredmények átfedésben álltak a két adatbázisban, míg a Co.I._1-et és a Co.I._3-at *Carassius auratusként*, addig a Co.I._2-t és Co.I.-4-et *Carassius gibelioként* azonosította a rendszer. Ennek ellenére a szekvencia azonosításokat nagy körültekintéssel és minél több molekuláris genetikai markerrel érdemes ellenőrizni, mert az ilyen jellegű informatikai adatbázisok még nem képesek önállóan kiszűrni a hibákat, melyek a pontatlan feltöltésekből, rosszul meghatározott szekvencia sorrendekből és a téves rendszertani egységekbe osztott egyedektől származó minták elemzéséből adódnak.

3.3 A garda

3.3.1 Mikroszatellit markerek adaptációja garda fajra

Mivel a gardát (*Pelecus cultratus*) mindezidáig nem vizsgálták mikroszatellit markerekkel, nagyon kevés előzetes vizsgálat, vagy kiindulási alap állt rendelkezésre. A mitokondriális markerek mellett célom volt egy átfogóbb fajspecifikus vizsgálat mikroszatellit markerekkel. Mivel kősüllő esetén is bizonyítottan működött a fajok közötti marker adaptáció, első körben a közeli rokon fajokból igyekeztem már működő mikroszatellit markereket adaptálni (Baerwald & May, 2004; Barinova et al., 2004; Urbánková et al., 2013; Hosseinnia et al., 2014). Akárcsak a kősüllő esetén, a változó értékek a PCR protokoll optimalizálása során itt is elsősorban a $MgCl_2$ mennyisége, a primerek feltapadási hőmérséklete és a ciklusszámok voltak.

Összesen 11, a szakirodalom alapján választott mikroszatellit markert teszteltem. A 11 markerből a protokollok optimalizálása után 5 marker esetén sikerült PCR terméket felszaporítani (Albi22, Albi61, Albi462, Gob28, CypG24), de ezek közül 2 marker esetén (Albi462, CypG24) annyi áltermék és egyéb fragment szaporodott fel, hogy az eredmények kiértékelhetetlenek voltak, és további optimalizálással sem sikerült csökkenteni a „zaj” mennyiségét. Három marker (Gob28, Bl1, Albi22) a kapilláris gélelektroforézis eredményei alapján monomorfnak bizonyult. Egyetlen mikroszatellit marker, az Albi 61 bizonyult polimorfnak, de az is pusztán 3 alléllal rendelkezett. Egyetlen három allélos mikroszatellit marker önmagában populációgenetikai vizsgálatra nem alkalmas.

3.3.2. A garda mitokondriális vizsgálata

A három garda (*Pelecus cultratus*) populáció (Balaton, Fertő, Lengyelország) mitokondriális D-loop régiójának vizsgálata során 125 szekvenciát tisztáztam és illesztettem. Az így kapott 803 bázispár hosszú konszenzus szekvenciák szoftveres elemzésekor 5 haplotípust mutattam ki. A haplotípus csoportokat meghatározó 4 polimorf bázis helyből kettő bizonyult filogenetikai szempontból informatív pozíciónak. Mind a mintaszámok, mind a mintavételi helyek közötti földrajzi távolság alapján ez a változatosság rendkívül alacsony, gondoljunk csak a 8 mintával több ezüstkárász állomány során kapott 22 haplotípusra. Az egyedek többsége ráadásul (104 minta) a 125-ből a leggyakoribb 1-es haplotípust hordozza.

A Lengyelországban található Visztula-lagúnából származó minták mindegyike ebbe a leggyakoribb csoportba tartozik. A második haplotípus (Hap_2) kizárólag a Fertőből származó mintákból került elő, a Hap_3, Hap_4 és Hap_5-ös haplotípust pedig csak balatoni minták hordozták. A balatoni gardák esetén található tehát a legtöbb haplotípus. A csak fertői mintákban előforduló Hap_2-esen kívül mindegyik haplotípusban található balatoni minta, beleértve a két ritka Hap_4 és Hap_5-öt is. A teljesen homogén lengyel Visztula-lagúnából származó populáció esetében a populáción belüli genetikai differenciáltsági számításoknak nincs értelme, hiszen a vizsgált szekvenciák alapján nem volt kimutatható változatosság az egyedek között.

A haplotípus diverzitás (Hd) értéke a Fertő esetén 0,7 (± 0,05), a Balaton esetében pedig 0,41 (± 0,08). Bár a fertői minták csak két haplotípust hordoznak, de azt fele akkora mintaszámból (n:23), mint a balatoni. A Fu-féle Fs érték mutatja a legnagyobb különbségeket a két populáció esetében. Míg a Balatonnál -4,09, addig a fertői populációban pozitív értéket vett föl (1,28). A negatív érték a Balaton esetén akár egy nemrég bekövetkező létszám növekedésre is utalhat. A Fu-féle Fs alapján a Fertő esetében feltételezhető, hogy a populáció a 2017-es mintázási évet megelőzően palacknyak effektuson esett keresztül. Mivel a fertői garda populáció egy őshonos, önfenntartó populáció egy esetleges betegség vagy bármilyen külső tényező, mely létszám csökkenéssel jár, könnyen elérheti ezt a hatást. A Tajima féle D-érték a Balaton esetében -1,67, míg a Fertői populációban pozitív 1,23-as értéket vett föl. A negatív érték a populációdinamikai vizsgálatoknál a mutációs ráta növekedéséből fakadhat, mely összhangban áll a pozitív Fu-féle Fs érték alapján becsült növekvő állománnyal.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS A JAVASLATOK

4.1. Marker adaptálhatóság rokon fajok között

A kősüllő (*Sander volgensis*) esetén a marker adaptáció összességében sikeresnek bizonyult. A kiválasztott 13 süllő mikroszatellitből mindössze 2 marker (MS423, MS424) volt, melyekkel a protokollok többszöri változtatása után sem sikerült a PCR során terméket felszaporítani. Hat marker (MS 420, MS 417, MS 192, MS 384, MS 373, MS 703), melyek a süllő fajban polimorfnak bizonyultak (Kánainé et al., 2019a), a vizsgált kősüllő populációk esetén monomorfnak mutatkoztak, vagy csupán 2 allélt hordoztak, így nem alkalmazhatóak a fajban populációk diverzitásának mérésére. A PIC értékek alapján az 5 kellő mértékben polimorf marker (MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSl-1) mindegyike alkalmasnak bizonyult a magyar kősüllő populációk vizsgálatához. Az eredmények alapján azonban elmondható, hogy a különböző fajok közötti marker adaptációkor nemcsak a polimorfitás mértéke különbözhet, de az egyes mikroszatellit markerekkel detektált allélméretek is.

Átfogóbb vizsgálatokhoz a kősüllő populációk genetikai hátterét illetően további nukleáris markerek bevonása javasolt, mely többek között a rendelkezésünkre álló további süllő markerek adaptációjával lehetséges.

A garda (*Pelecus cultratus*) esetében a marker adaptáció nehezebb volt, hiszen nincs olyan közeli rokona, mint a kősüllőnek a fogassüllő, mivel a garda a *Pelecus* nemzettség egyetlen tagja. Szakirodalmi adatok alapján 11 markert került kiválasztásra 5 közel rokon, a pontyfélék családjába tartozó fajtól, melyek a sujtásos küsz (*Alburnoides bipunctatus*), bodorka (*Rutilus rutilus*), ponty (*Cyprinus carpio*), fenékjáró küllő (*Gobio gobio*) és a vaskos csabak (*Leuciscus souffia*) voltak. A 11 kiválasztott markerből 6 marker esetén sikerült PCR terméket amplifikálni, ami bár picit több, mint 50%, de messze elmarad a kősüllőnél mért eredményességtől.

Önmagában egy marker nem elég egy populáció jellemzésére, de a jövőben, ha sikerül újabb markereket adaptálni, vagy könyvtár-készítéssel izolálni, már lehetőségünk lesz egy átfogóbb vizsgálatra. Jelen munka pedig bizonyítja, hogy az adaptáció nem lehetetlen, még olyan fajok esetében sem, melyek önálló genuszba tartoznak. Bár ennél a vizsgált populációnál a markerek többsége, melyekhez sikerült működő PCR protokollt létrehozni, monomorfnak bizonyultak, más, genetikailag változatosabb állományokon lehetnek polimorfak.

4.2. Kősüllő populációgenetikai vizsgálatok

Az 5 darab süllőből izolált polimorf mikroszatellit marker (MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSL-1) és a mitokondriális genom kontroll régiója (D-loop) alkalmasnak bizonyult a Balaton, a Duna és összevonva a Tisza és Holt-Körös populációiból vett minták genetikai diverzitásvizsgálatára. A mikroszatellitek esetén érdemes lenne több markert is bevonni a későbbi vizsgálatokba, valamint a Tisza és Holt-Körös területéről több mintát begyűjteni, de ez ekkora területről nehezebb feladat. Mivel a kősüllő kiemelten kedvelt a horgászok körében, érdemes lenne a jövőben a mintázások kapcsán felvenni a kapcsolatot a környéken lévő horgász szövetségekkel.

Mind a mikroszatellit markerek esetén kimutatható egyedi allélszám, mind a mitokondriális genom D-loop régiója alapján meghatározott haplotípusokat figyelembe véve elmondható, hogy a balatoni kősüllő populáció olyan ritka genetikai háttérrel rendelkező egyedeket tartalmaz, mely alapján a populáció értékes genetikai erőforrás lehet az esetlegesen beszűkült genetikai háttérrel rendelkező kisebb állományok vérfrissítéséhez, illetve új állományok létrehozásához.

A populációk közötti genetikai távolságok a vártnál kisebbek, ám arányosak a földrajzi távolságokkal, vagyis a földrajzilag két legtávolabbi állomány között a legnagyobb a genetikai különbség. Mindez lehet horgász célú telepítések következménye, amelyet kevés, esetleg dunai, vagy balatoni eredetű tenyészállat felhasználásával végeztek.

Mivel már rendelkezésünkre állnak működő markerek és protokollok, az eredmények alapján érdemes lenne egy második mintázási és vizsgálati kört tartani, több egyed és populáció bevonásával. Ez megválaszolhatná, hogy az eddigi ellenőrizetlen telepítések milyen hatással vannak a kősüllő természetes állományaira, vagy hogy a populációkat a mintavételkor jellemző diverzifikáltság tovább romlott-e, illetve (mivel a FAO adatai között jelenleg az utolsó fogási adat 2018-as), szükséges lenne ezen adatokat is frissíteni, hogy átfogóbb véleményt lehessen mondani, a hazai állományok állapotáról.

4.3. Ezüstkárász populációgenetikai vizsgálatok

A 22 haplotípusnak, amit a mitokondriális vizsgálat során kaptunk több mint a fele csak 1 vagy 2 mintában volt jelen, ami a hazai állomány változatos származására utal. A kapott eredményekből kitűnik az Őszödi-berek populációjának teljes elkülönülése. Az innen mintázott halak mindössze két, a többi populációtól teljesen elkülönült haplotípust hordoznak. Az Őszödi-berek mára már nemcsak földrajzilag, de genetikailag is teljesen elszigetelt populáció. Annak oka, hogy a szintén többi mintavételi hellyel élő kapcsolatban nem álló Hőgyész miért hordoz vegyesen többféle haplotípust, és miért nem alakult ki ott is egy, csak arra a tóra jellemző ezüstkárász állomány, nem ismert, de nagy valószínűséggel magyarázható a tavon és vízrendszerén végzett telepítésekkel.

A többitől legeltérőbb szekvenciával rendelkező egyedek a nukleotid diverzitások alapján a Siófok-Töreki populációban voltak. Ez a populáció volt az, mely rávilágít, hogy az ún. kárász komplex tagjai kapcsán a szakirodalomban fellelhető taxonómiai kérdéseknek itthon is van létjogosultsága. Erre utal a BLAST analízis eredménye, mely kimutatta a fenotípusosan egyértelműen ezüstkárász minták között jelenlévő 5 *Carassius auratus auratus* haplotípust, illetve a *Carassius auratus buergeri* haplotípust. A Citokróm *b* marker alapján történő BLAST keresés a fenotípusnak megfelelően mindegyik korábbi D-loop haplotípust *Carassius gibelio*-ként azonosította.

A Citokróm oxidáz 1. régiók illesztése a BOLD rendszerben, valamint a BLAST vizsgálatok a haplotípusok egy részét szintén aranyhal eredetűnek jelezték, akárcsak a D-loop. Mindez lehet az aranyhalak és az ezüstkárász közötti hibridizáció következménye, amely jelenség jól ismert és így már hazánkban is bizonyítható. Az ilyen egyedek esetén ajánlott lenne a nukleáris DNS ilyen irányú vizsgálata is. Ugyanakkor az is feltételezhető, hogy az adatbázisokba tévesen rögzített vagy

azonosított szekvencia adatok is bekerültek, ami helytelen taxonómiai azonosításhoz vezethet. Ezek alapján, az ezüstkárász vizsgálatokban a kétes fenotípusú halak esetében, illetve más markerek alapján kétes eredetű szekvenciák azonosítására javasolt több marker és adatbázis használata.

Jelen eredmények alapján nagyon valószínű, hogy a kárász komplex tagjai közötti hibridizáció lezajlott a vizsgált vízgyűjtőn, és ennek köszönhető a *Carassius auratus aruatus* és a *Carassius auratus buergeri* szekvencia megjelenése a minták között.

4.4. Garda populációgenetika vizsgálatok

A mitokondriális genom kontroll régiójának vizsgálata a három garda populáció esetén aggasztó eredményt hozott. A közösségi jelentőségű halfajként számontartott őshonos garda populációi rendkívül alacsony diverzitást mutattak a mitokondriális D-loop marker alapján. A 125 egyed szekvenciái alapján azonosított, mindössze 5 haplotípus rendkívül kevés. A minták több mint 85%-a ugyanazt a szekvencia variációt hordozza, ami rendkívül meglepő tekintve, hogy a minták egy része a referenciaként bevont lengyel Visztula-lagúnai populációból származik, ami földrajzilag meglehetősen távol esik a többi populációtól. Ennek ellenére a lengyel minták nem különültek el a magyartól, sőt egyetlen, a leggyakoribb haplotípusba sorolódnak. A lengyel garda populáció ugyanis mitokondriálisan teljesen homogén. Egy fokkal nagyobb diverzitást mutat ezen a szinten a fertői populáció, ahol az egyedek két külön haplotípust hordozó csoportba kerültek. Bár a kétféle haplotípus sem túl előnyös diverzitás szempontból, (arra utal, hogy mindössze két ősi anyai vonalról származik a teljes vizsgált állomány), különösképpen egy elszigetelt populáció esetén, de ki kell emelni, hogy ebből az egyik csoport (Hap_2) csak a Fertőre jellemző, ezáltal igen értékes.

A jövőben érdemes lenne még több mikroszatellit markert adaptálni vagy izolálni és egy nagyobb volumenű munka keretében további információkat begyűjteni a vizsgált területek garda populációiról. Új SNP vagy mikroszatellit markereket fejleszteni, és a garda állományok nukleáris genomját is megvizsgálni azokkal. Ha a nukleáris markerek esetén is ilyen alacsony diverzitás figyelhető meg, a faj érdekében érdemes lenne génmegőrzési lépéseket tenni. A garda, mint közösségi jelentőségű halfaj megőrzése a törvény által is kimondva az európai közösség kiemelt feladata. Ha az állomány genetikai homogenitása további alátámasztást nyer, az azt jelenti, hogy akár egyetlen ismeretlen betegség megjelenése az egész állományt veszélyezteti.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Vizsgálataim alapján az új tudományos eredmények:

1. A PCR protokollok optimalizálásával 11 mikroszatellit markert (MS 420, MS 417, MS 192, MS 384, MS 373, MS 703, MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSL-1) sikeresen adaptáltam fogassüllő (*Sander lucioperca*) fajból kősüllőre (*Sander volgensis*) és egy 1 mikroszatellit markert (Albi61) sujtásos küszből (*Alburnoides bipunctatus)* gardára (*Pelecus cultratus*).

2. Öt újonnan adaptált és polimorf mikroszatellit markerrel (MS 701, MS 704, MS 404, MS 395, MSL-1), valamint a mitokondriális genom kontroll régiójával elvégeztem 3 magyar kősüllő állomány (Balaton, Duna, Tisza_Holt-Körös) populációgenetika vizsgálatát. Megállapítottam, hogy a populációk eltérnek a Hardy-Weinberg egyensúlytól, és közülük a balatoni hordozza a legegyedibb, ezáltal génmegőrzési szempontból a legértékesebb genetikai hátteret.

3. Három, a szakirodalomban már korábban jól jellemzett mitokondriális genetikai markerrel (Citokróm *b*, Citokróm oxidáz 1-es alegység, D-loop) elvégeztem a Balaton és vízgyűjtőterületén található 5 és egy további ezüstkárász (*Carassius gibelio*) populációjának filogenetikai analízisét. Ennek során meghatároztam a kárász komplex tagjainak taxonómiai azonosítására leginkább alkalmas markert (Cyt.B).

4. Bizonyítottam, hogy a magyarországi ezüstkárász állományban aranyhal eredetű mitokondriális genomot hordozó egyedek is megtalálhatóak.

5. A világon elsőként populációgenetikai vizsgálatot végeztem 2 magyar és 1 lengyel garda populáción. Megállapítottam, hogy mind a hazai, mind a lengyel populációk aggasztóan homogén genetikai háttérrel rendelkeznek.

6. A SZERZŐNEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓI

Nemzetközi folyóirat

Ősz Á., Horváth Á., Hoitsy Gy., Kánainé Sipos D., **Keszte Sz**., Sáfrány J., Maric S., Palkó Cs., Tóth B., Urbányi B. (2018): The genetic status of the Hungarian brown trout populations: exploration of a blind spot on the European map of Salmo trutta studies; PEERJ 6 Paper: e5152, 26 p. (2018)

Keszte Sz., Ferincz Á., Tóth-Ihász K., Balogh R., E., Staszny Á., Hegyi Á., Takács P., Urbányi B., Kovács B. (2021): Mitochondrial sequence diversity reveals the hybrid origin of invasive gibel carp (Carassius gibelio) populations in Hungary. PeerJ, 9, e12441. https://doi.org/10.7717/peerj.12441

Hazai folyóirat

Keszte Sz., Stein R., Kánainé S. D., Balogh E., Zellei Á., Sebestyén A., Balogh R., Guti Cs. F., Bokor Z., Urbányi B., Kovács B. (2017): Mitokondriális genetikai vizsgálat a velencei-tavi vadponty anyajelöltjeinek állományán; Animal welfare, Etológia és Tartástechnológia; 2017. XIII/2 p. 74-80

Keszte Sz., Mészáros O., Kánainé S. D., Balogh E., Zellei Á., Sebestyén A., Balogh R., Guti Cs. F., Bokor Z., Urbányi B., Kovács B. (2017): Velencei ponty állomány diverzitásának mikroszatellit markerekre alapozott genetikai vizsgálata; Animal welfare, Etológia és Tartástechnológia; 2017. XIII/2 p. 68-73

Keszte, Sz.; Kánainé, S. D.; Stein, R.; Mészáros, O.; Balogh, E.; Zellei, Á.; Sebestyén, A.; Balogh, R.; Guti, Cs F.; Bokor, Z et al. (2018): Velencei-tavi vadponty tájfajta Kajászói Tógazdaságban fenntartott anyajelölt állományának genetikai diverzitás vizsgálata HALÁSZAT 4.: 1 pp. 3-9., 7 p.

Konferencia kiadvány

Külföldi konferencia kiadvány (oral presentation):

Keszte Sz., Tóth-Ihász K., Balogh R., Ferincz Á., Staszny Á., Józsa V., Urbányi B., Kovács B. (2019): Molecular genetic diversity of hungarian silver prussian carp carassius auratus gibelio populations based on mitochondrial d-loop sequences. (oral presentation), Aquaculture Europe 2019, Internration Conference and Exposition, Berlin, Germany, 2019 October 7-10., Book of abstracts pp. 677-678

Hazai konferencia kiadvány (előadás):

Keszte Sz.: Süllő (*Sander lucioperca*) mikroszatellit markerek alkalmazásának lehetősége a kősüllő (*Sander volgensis*) genetikai diverzitás vizsgálatára; Tavaszi Szél Konferencia (Doktoranduszok Országos Szövetsége); Győr, 2018. május 4-6; Book of abstracts pp. 50

Keszte Sz, Balogh R, Dr. Bernáth G, Dr. Bokor Z, Molnár J, Várkonyi L, Dr. Ferincz Á, Dr. Staszny Á, Dr Józsa V, Dr. Urbányi B, Dr. Kovács B: Molekuláris módszerek fejlesztése a Balaton közösségi jelentőségű halfajainak populáció genetikai vizsgálatához; XXXVII. Óvári Tudományos Napok; Mosonmagyaróvár; 2018. november 9.-10. Book of abstracts pp. 150-150., 1 p.

Keszte Sz, Tóth-Ihász K., Balogh R. E., Dr. Ferincz Á., Dr. Stasznyy Á., Dr. Urbányi B., Dr. Kovács B.: A balaton ezüstkárász (*Carassius auratus gibelio*) állományának genetikai diverzitás vizsgálata mitokondriális genomi vizsgálatok alapján, XXII. Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen; 2019. május 3-5; Book of abstracts pp 62.

Keszte Sz, Tóth-Ihász Katalin, Balogh Réka Enikő, Ferincz Árpád, Stasznyy Ádám, Józsa Vilmos, Urbányi Béla, Kovács Balázs: Magyarországi ezüstkárász (*Carassius auratus gibelio*) populációk genetikai diverzitás vizsgálata, (VII. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Nap, 2019. november. 22; Book of abstracts p. 52

Hazai konferencia kiadvány (poszterek):

Keszte Sz., Balogh E., Ősz Á., Uri Cs., Guti Cs., Bokor Z., ifj. Radóczi J., Urbányi B., Kovács B.: Sügér állományok diverzitásának mitokondriális DNS-re alapozott molekuláris genetikai vizsgálata; XXXVI. Óvári tudományos nap. Mosonmagyaróvár; 2016. november 10. Book of abstracts pp. 286-287., 2 p.

Keszte Sz, Kánainé S D, Balogh R, Bokor Z, Bernáth G, Várkonyi L, Urbányi B, Kovács B.: Multiplex PCR módszer fejlesztés kősüllő (*sander volgensis*) genetikai diverzitás vizsgálatához; XLII. Halászati Tudományos Tanácskozás; Szarvas, 2018. május 30-31, Book of abstracts p. 52

Keszte Sz., Tóth-Ihász K., Balogh R., Dr. Ferincz Á., Dr. Stasznyi Á., Dr. Bokor Z., Dr. Bernáth G., Várkonyi L., Dr. Józsa V., Dr. Urbányi B., Dr. Kovács B.: A balatoni ezüstkárász (carassius auratus gibelio) populációk genetikai diverzitás vizsgálata a mitokondriális genom szekvenciák alapján; XLIII. Halászati Tudományos Tanácskozás; Szarvas, 2019. május 29-30. Book of abstracts p. 99-100.