Szent István Egyetem

Az afrikai harcsa ivarának vizsgálata molekuláris genetikai módszerekkel

Doktori értekezés

Kovács Balázs

Gödöllő

2004

A doktori iskola

Címe: Állattenyésztéstudományi Doktori Iskola

Tudományága: Mezőgazdaságtudomány

Vezetője: Prof. Horváth László, DSc.
tanszékvezető egyetemi tanár

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi kar,
Halgazdálkodási Tanszék

Témavezető: Dr. Orbán László, Ph.D.
Tudományos főmunkatárs,

Korábbi munkahely:
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Hal Molekuláris Biológiai Laboratórium
Jelenlegi munkahely:
Temasek LifeSciences Laboratory
Reproductive Genomics Group

Társtémavezető: Dr. Varga László, Ph.D.
Tudományos főmunkatárs,

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont
Genom-térképezés Állatokon Laboratóriuma

……. ……..
A programvezető jóváhagyása A témavezetők jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 1

1. BEVEZETÉS 3

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 5

2.1 Az ivaros szaporodás formái az állatvilágban 5
2.2 AZ Ivar kialakulását meghatározó tényezők az állatoknál 6
2.2.1 Környezeti ivardetermináció 6
2.2.2 Genetikai ivardetermináció 10
2.2.2.1 Ivari kromoszóma rendszerek 12
2.2.2.2 Az ismert ivari kromoszómák fő jellegzetességei 16
2.2.3 Az ivardeterminációs rendszer azonosításának módszerei a halaknál 19
2.2.3.1 Klasszikus eljárások 19
2.2.3.2 Ivarhoz kötött tulajdonságok, enzimek és gének 21
2.2.4 Ivardetermináció a harcsaféléknél 24
2.3 Genetikai markerek 26
2.3.1 A RAPD markerek és felhasználási lehetőségeik 27
2.3.2 Mikroszatellit markerek és felhasználásuk lehetőségei 29

3. ANYAG ÉS MÓDSZER 33

3.1 Felhasznált anyagok 33
3.2 Kísérleti állatok 33
3.3 Tartási és nevelési körülmények, szaporítás 34
3.4 Mintavétel, DNS izolálás 35
3.5 Mintagyűjtés és mintaelőkészítés lárvák ivarmeghatározásához 36
3.6 RAPD analízis 36
3.7 Fragmentek klónozása, szekvenálása és az adatok analízise 38
3.8 Southern hibridizáció 39
3.9 “Zoo hibridizácó” 40
3.10 Részleges genomi könyvtár készítése és vizsgálata 40

3.11 Multiplex PCR reakciók 42
3.12 Az ivarspecifikus markerek tesztelése lárvák molekuláris szexálásával 44

4. EREDMÉNYEK 45
4.1 Ivarspecifikus DNS markerek keresése harcsa- és pontyfélék genomjában 45
4.2 Az izolált markerek szekvenciáinak jellemzése 48
4.3 Az ivarspecifikus markerek vizsgálata Southern hibridizációval 50
4.4 Az ivarspecifikus markerek homológjainak keresése más harcsafajokban 51
4.5 A markerek párhuzamos amplifikációja multiplex PCR reakciókban 55
4.6 A markerek alkalmazása a fenotípusos ivar előrejelzésére 57
4.7 Mikroszatellit szekvenciák azonosítása homológ-keresés során 59

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK 61
5.1 Ivarhoz kapcsolt DNS markerek keresése halakban 61
5.2 A CLARIAS gARIEPINUS-ból izolált két ivarspecifikus marker 63
5.3 A markerek ivarspecifikusságának részletes vizsgálata 65
5.4 A CgaY1 és CgaAY2 markerek lehetséges homológjai rokon fajokban 66
5.5 Az afrikai harcsa ivari kromoszómarendszere XX/XY típusú 67
5.6 Miroszatellit szekvenciák a Clarias batrachus genomjából 69
5.7 Gyakorlati használatra alkalmas molekuláris szexálási eljárás kidolgozása 69
5.8 A Gyakorlati felhasználás tapasztalatai 70
5.9 Javaslatok az ivarspecifikus markerek hasznosítására 72

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK 75

7. ÖSSZEFOGLALÁS 77

8. SUMMARY 81

9. IRODALOMJEGYZÉK 83

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 105

11. MELLÉKLETEK 107

M1 A felhasznált pufferek és oldatok 107

M2 A felhasznált 598 RAPD primer listája: 108

M3. PCR2.1-TOPO vektor felépítése 109

M4. Bluescript KS+ plazmid vektor (Strategene) felépítése. 110

M5 Az ivarspecifikus és kontroll fragmentek marker szekvenciái 111

M6 A CgaY1 szekvenciával legszorosabb homológiát mutató Clarias batrachus klón szekvenCiája 113

M7 A Homológ-keresés során azonosított Clarias batrachus mikroszatellit primer szekvenciái. 114

M8 A Clarias batrachus genomi könyvtárból származó mikroszatellit tartalmú klónok szekvenciái 115

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABI	—	**A**pplied **Bi**osystems
Anti-DIG-AP	—	Juhból származó anti-digoxigenin ellenanyag alkalikus foszfatáz konjugátuma
AP-PCR		Tetszőlegesen választott primerrel végrehajtott PCR (**A**rbitrarily **P**rimed **PCR**)
BLAST	—	Szekvenciák összehasonlítására szolgáló programcsomag (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool)
bp	—	**B**ázis**p**ár
CDP-Star	—	Alkalikus foszfatáz kemilumineszcens szubsztrátja 2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor) Tricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat,
CgaK1	—	*Clarias gariepinus* kontroll fragment 1.
CgaY1	—	*Clarias gariepinus* hímivar-specifikus fragment 1.
CgaY2	—	*Clarias gariepinus* hímivar-specifikus fragment 2.
cM	—	**C**enti**m**organ (relatív genetikai térkép távolság, értéke egy, ha két pont között az utódok 1%-ában zajlik le rekombináció)
CSD	—	Kromoszómális ivardetermináció („**C**hromosomal **s**ex **d**etermination”)
CSPD	—	Alkalikus foszfatáz kemilumineszcens szubsztrátja Disodium 3-(4-methoxyspiro {l,2-dioxetane-3,2'-(5'-Chloro) Tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl) Phenylphosphat
DIG	—	Digoxigenin
DIG-11-dUTP	—	Digoxigenin-11-(2'-deoxyuridine 5'-triphosphate)
E.coli	—	***E**scherichia **coli***
ESD	—	Környezeti ivardetermináció („**E**nvironmental **S**ex **D**etermination”)
EDTA	—	Etilén-diamin-tetraecetsav
ExoI	—	**Exo**nukleáz **I**.
FISH	—	**F**luoreszcens ***In S**itu* **H**ibridizáció

GH-2	—	2-es típusú növekedési hormon génnel rokonságot mutató (GH-2) pszeudogén
GSD	—	Genetikai ivardeterminació („**G**enetic **s**ex **d**etermination”)
IPTG	—	**I**so**p**ropyl-beta-D-**t**hio**g**alactopyranside
kb	—	**K**ilo**b**ázispár
lacZ	—	*E.coli* ß-galaktozidázt kódoló gén
PCR	—	Polimeráz láncreakció (**P**olymerase **C**hain **R**eaction)
PTEN	—	Foszfatáz és tenzin homológ
PTP	—	Protein-tyrosine phosphatase (alternatív rövidítése TPT)
RAPD	—	Véletlenszerűen felsokszorozott DNS polimorfizmus (**R**andom **A**mplified **P**olimorphic **D**NA)
RFLP	—	fragmenthossz polimorfizmus (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)
SAP	—	Rákból izolált alkalikus foszfatáz
SCAR	—	**S**equence **C**haracterised **A**mplified **R**egion
SDS	—	Natrium-dodecil-szulfát
SSD	—	Szociális ivardeterminació („**S**ocial **S**ex **D**etermination”)
SSR	—	egyszerű szekvencia ismétlődés („**S**imple **S**equence **R**epeat”)
STR	—	rövid tandem ismétlődés („**S**hort **T**andem **R**epeat”)
Taq polimeráz	—	***T**hermophylus **aq**uaticus-ból* izolált hőstabil DNS polimeráz enzim
TSD	—	Hőmérséklettől függő ivardeterminació („**T**emperature-**d**ependent **s**ex determination”)
TIGR	—	**T**he **I**nstitute for **G**enomic **R**esearch
TPT	—	Tirozin foszfatáz (PTP)
UBC	—	**U**niversity of **B**ritish **C**olumbia
VNTR	—	Változó számú tandem ismétlődés (Variable Number of Tandem Repeats)
X-gal	—	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid

1. BEVEZETÉS

Kutatómunkámat az MBK Hal Molekuláris Biológiai Laboratóriumában végeztem. A csoport egyik fő kutatási területe azoknak a mechanizmusoknak a megismerése volt, amelyek az ivar kialakulásában játszanak szerepet a halak egyedfejlődése során. Ennek keretén belül fontos részterület az ivarhoz kötött DNS markerek azonosítása halakból és az ivari kromoszóma rendszerek vizsgálata ezen markerek segítségével.

A halaknál még csak kis mértékben érzékelteti hatását az emlősök és madarak esetében egyre inkább előtérbe kerülő molekuláris biológiai megközelítés, amely az állattenyésztés más ágazataihoz hasonlóan a halbiológia és a haltenyésztés számára is számos hasznos módszert kínál. Ilyen az emlősöknél már régóta alkalmazott molekuláris szexálás is. Halaknál csak néhány ivarhoz kötött marker ismert (pl. Allendorf és mtsai.,1994; Andreata és mtsai., 1993) és ezek sem általánosak, csak adott halfajon alkalmazhatóak. Az ismert markerek többsége a *Salmonidae* családba tartozó fajokból származik, a többi hazánkban tenyésztett haszonhalból ezzel szemben munkám kezdetéig még nem sikerült ilyen markereket izolálni, holott jelentőségük nyilvánvaló. Egy molekuláris szexálási eljárást fel lehet használni értékes tenyészegyedek ivaranak korai meghatározására, tenyeszallomanyok ivararányának beállítására, vagy ivari csoportok létrehozására. Jelentős szerepe lehet az egyes ivarok vizsgálatát célzó kutatások megalapozásában, vagy teljes genommanipulációval létrehozott egyivarú (un. “monosex”) állományok gyors tesztelésében. Utóbbi fontossága azon fajoknál gazdasági szempontból is kiemelkedő lehet, ahol a két ivar növekedési erélye jelentősen eltér egymástól, mint például a lesőharcsánál (Haffray és mtsai., 1998).

Kutatócsoportunk kísérletei alanyául a magyarországi halfauna talán két legfontosabb taxonómiai csoportját, a pontyféléket és harcsaféléket választotta. Kollégáim korábban ivarspecifikus markerek izolálása céljából pontyon (*Cyprinus carpio L.*), rózsás díszmárnán (*Barbus conchonius*) és zebradánión (*Danio rerio*), míg együttműködőim tilápián (*Oreochromis niloticus*) és „sárkányhalon” (dragonfish, *Scleropages formosus*) végeztek kísérleteket. Az én fő témám a harcsafélék vizsgálata volt, ezért disszertációm túlnyomó része az utóbbi fajok vizsgálatából nyert eredményeken alapul, azonban kísérletet tettem ivarspecifikus DNS markerek azonosítására egy a pontyfélékhez tartozó fajból, a compóból (*Tinca tinca*) is.

Célunk olyan ivarhoz kötött DNS markerek azonosítása volt, amelyek lehetővé teszik már az egyedfejlődés kezdeti stádiumában az ivarok elkülönítését és alkalmasak lehetnek a vizsgált halfajok ivari kromoszóma típusának megállapítására (XX/XY vagy ZW/ZZ) is.

Az én feladatom a markerek keresésében való részvétel mellett a megtalált ivarspecifikus markerek izolálása és jellemzése volt. Szintén én végeztem a markerek DNS szekvencia meghatározását követően, azok felhasználását olyan polimeráz láncreakción (PCR) alapuló teszteljárás kidolgozására, amely gyors és akár már embrionális korban is alkalmas az ivarok elkülönítésére. Feladataim között szerepelt még az izolált ivarspecifikus DNS marker taxonómiai alkalmazhatóságának vizsgálata, elsősorban a szűkebb rokonságba tartozó harcsafajokon, de siker esetén rendszertanilag távolabb eső halfajokon is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 AZ IVAROS SZAPORODÁS FORMÁI AZ ÁLLATVILÁGBAN

Az ivaros szaporodás képessége már a rendszertanilag igen alacsony kategóriákba tartozó csoportoknál megjelenik. Az eukarióták legtöbbjének már megvan ez a képessége (Charlesworth, 1991; Seidel, 2000) és végeredményként minden esetben hím és nőivarú gaméták termeléséhez vezet a fejlődés valamely ciklusában. Az ivaros szaporodás előnye az ivartalannal szemben, hogy a gaméták random kombinációja és genetikai anyaguk átrendeződése (rekombináció) minden egyes generációban új genotípusok letrejöttét teszi lehetővé, melyek jobb eséllyel védekezhetnek a kórokozók ellen (Charlesworth, 1991). A két ivar kialakulásához azonban rendkívül változatos, egymástól jelentősen eltérő biológiai mechanizmusokon keresztül juthatnak el a különböző élőlények.

Az eltérő ivarú egyedek fenotípusa is rendkívül változatos az egyes rendszertani kategóriákba tartozó fajoknál. A hímnős fajok esetében a hím és nőivarú gamétákat ugyanazon egyed termeli. A szinkronizált hermafroditák esetében ez egyszerre történik, vagy ugyanabban az ivarmirigyben (pl.: éti csiga; Gomot-de Vaufleury, 2001) vagy külön ivarszervekben (pl.: *Caenorhabditis elegans*; Madl, 1979).

Egy másik csoportnál, a szekvenciális hermafroditáknál, az egyedek egyszerre csak egyféle ivarsejtet termelnek, de ez életük során változik. Ennek megfelelően kétfélék lehetnek: a „protandrous” hermafroditák először hímmé fejlődnek, majd később nőivarúvá alakulhatnak (Brusle´ Sicard és Fourcault, 1997; Godwin, 1994b) míg a „protogynous” hermafroditáknál először a nőivar fejlődik ki, mely később hímivarúvá alakulhat (Shapiro és Rasotto, 1993; Reinboth és Brusle´ Sicard, 1997)

Az ivarváltás többféleképpen is megtörténhet, így például a *Pandalus borealis* (*Pandalidae*) nevű tengeri rákocska esetében az egyed fejlettségi állapota határozza meg, hogy az milyen ivarsejteket termel. A kistestű hímekből később nagytestű nőstények fejlődnek (Charnov, 1979).

Ugyanakkor létezik a szekvenciális hermafrodita fejlődésnek egy másik formája is, ahol a kifejlett egyed ivara a szociális környezet hatására dől el (Social Sex Determination, SSD). Ennek egyik legszemléletesebb példája a *Crepidula fornicata* nevű papucsos csiga, amelynek kifejlett

nőstényei akár 6-7 fajtársukat is a hátukon hordozzák. A kisebb testű fiatal egyedek kezdetben hímekké differenciálódnak, amelyek egy, vagy több másik hím egyeddel érintkezve elkezdenek nőivarúvá alakulni, de csak akkor válnak teljesen azzá, ha megszűnik kapcsolatuk a kifejlett nőivarú egyeddel (Coe, 1936).

A halak osztályában a hermafroditáknak mind a szinkronizált a „protandrous" és a „protogynous" változatai megtalálhatók (Devlin és Nagahama, 2002).

Az élőlények másik, talán legfejlettebb csoportját alkotják a váltivarú fajok, amelyeknél az egyed csak egyféle ivarszervvel rendelkezik, és egyféle ivarsejtet termel élete során. Az állatok és így a halak többsége is ebbe a kategóriába tartozik (Charlesworth, 1991, Uguz és mtsai., 2003).

2.2 AZ IVAR KIALAKULÁSÁT MEGHATÁROZÓ TÉNYEZŐK AZ ÁLLATOKNÁL

A váltivarú állatoknál az ivar kialakulását alapvetően meghatározó tényezőket két nagy csoportra oszthatjuk, amelyek elkülönülten határozzák meg az egyes fajoknál, vagy nagyobb rendszertani egységeknél a kialakuló fenotípust. Ennek alapján vannak fajok, illetve nagyobb rendszertani egységek, amelyeknél az ivart környezeti hatások döntik el. Ezeknél a csoportoknál a zigóta fejlődése alatt ható környezeti faktorok befolyásolják, hogy hím- vagy nőnemű lesz az utód. Egy másik csoportot képeznek a genetikai ivar determinációval (Genetic Sex Determination, GSD) rendelkező fajok, amelyeknél már a megtermékenyítéskor eldől az utód neme (Gilbert, 2000).

2.2.1 Környezeti ivardetermináció

A környezeti ivarmeghatározással (Environmental Sex Determination; ESD) azoknál a fajoknál találkozhatunk, amelyeknél az ivar kialakulásának, vagy változékonyságának idején a környezeti tényezők közvetlen hatást gyakorolhatnak a fejlődő egyedre. Így elsősorban az alacsonyabb rendszertani kategóriákba tartozó, külső egyedfejlődéssel fejlődő fajok esetén, amelyeknél az anya nem biztosít védelmet a külső hatásokkal szemben. Ezen fajok életterének megfelelően az ivar kialakulásáért, vagy megváltozásáért felelős környezeti tényezők is többfélék lehetnek (Gilbert, 2000; Uguz és mtsai., 2003).

Az egyik ilyen lehetséges tényező a szociális környezet (SSD), amellyel kapcsolatban a legtöbb információnk a halaktól származik. Ebben az osztályban mind a „protandrous” (Godwin, 1994a), mind a „protogynous” fajoknál (Sakai, 1997) megtalálható ez a stratégia, sőt a *Gobio*-féléknél mindkét irányú ivarátfordulás is lehetséges szociális hatásra (Sunobe és Nakazono, 1993).

A vizsgált populációkban megtalálható egy ún. általános ivar, amely az egyedek fejlődése során először alakul ki és amellyel az egyedek többsége (általában a kisebb méretűek) rendelkezik. Az ellenkező ivart a populációban egy, legfeljebb néhány nagytestű domináns egyed képviseli. Ha ez a domináns egyed már nem tudja fenntartani a dominanciáját vagy eltűnik a populációból, akkor a rangsorban utána következő, legnagyobb egyed veszi át a helyét, miközben ivarátforduláson megy keresztül, amely megtörténhet néhány hét alatt (Godwin, 1994b), vagy néhány évig is elhúzódhat (Hattori, 1991). Maga a szabályozás valószínűleg a dominanciasorban levő egyedek és az ivarok közötti viselkedési interakciókon (stressz helyzeteken), a populáción belüli ivararányon, illetve feromonokon vagy más kémiai hatásokon keresztül valósul meg (Devlin és Nagahama, 2002). Ezen folyamatok molekuláris genetikai háttere igen kevéssé ismert.

Az SSD egy másik csoportját képviselik azok a váltivarú fajok, amelyeknél az egyed csak egyféle ivarsejtet termel életében, de a kialakuló ivar a környezetben található többi egyed ivarától függ, mint például a mélytengeri horgászhalak (ördöghalak). Ennél a fajnál feltételezhetően a kistestű hímből nagytestű nőstény lesz, amennyiben hím élete során nem találkozik nősténnyel. Az ivarok találkozása esetén viszont a hím szervesen hozzáépül a nőstényhez, vérköreik egyesülnek, miközben a hím teste redukálódik. Elveszti feleslegessé vált szerveit (szemek, emésztő- és légzőrendszer) és szexuális parazita életmódot folytat, mind a táplálékot, mind az oxigént a nőstény biztosítja számára. A két test együtt egy önmegtermékenyítő szinkronizált hermafrodita egyedhez hasonlóan él, azzal a különbséggel, hogy az ivarsejtek itt valójában két genetikailag különböző egyedtől származnak (Anderson és Leslie, 2001). Ugyanezt a stratégiát alkalmazza a *Bonellia viridis* nevű tengeri féreg, amelynél a nőivarú egyed 10 cm-es testtel és több, mint egy méteres táplálkozó nyúlvánnyal rendelkezik, ezzel szemben a hím mindössze 1-3 mm-es és a nőstény „uteruszában” telepszik meg. Ez egyben a legnagyobb ismert ivarok között tapasztalható méretbeli differencia is (Baltzer, 1912).

Az ESD egy második típusa a hőmérsékletfüggő ivarmeghatározás (Temperature-Dependent Sex Determination vagy TSD), amelyre érdekes módon a rendszertanilag magasabb kategóriába tartozó gerincesek körében található a legtöbb példa. Az 1970-es évektől kezdve derült fény arra, hogy a teknősök nagy részénél és a krokodilfélék összes fajánál a tojások inkubációs hőmérséklete határozza meg a születendő egyed ivarát (Charnov és Bull, 1977; Bull, 1980; Gilbert, 2000). Csupán pár Celsius fokos hőmérsékletváltozás eltérő ivar kialakulását eredményezheti.

Halaknál az ivarszerv a kikelést követő hetekben alakul ki (Piferrer és Donaldson, 1989). Ebben az időszakban, az érzékeny fajok esetében, az ivar is befolyásolható azáltal, hogy egyes a szervezetben működő enzimek aktivitása függ a környezeti hőmérséklettől. Ilyen enzim például az aromatáz, amely kiemelkedő szerepet játszik az ivari fejlődésben (a tesztoszteron ösztrogénné alakítása során). A gonokronisztikus (váltivarú) ponty esetében az aromataz aktivitása már a hőmérséklet kisebb fokú (5°C) változásának hatására huszad részére csökkenhet (Conover és Heins, 1987) ami jelentősen befolyásolhatja a fejlődő egyedek tesztoszteron és ösztrogén szintjén keresztül az ivar kialakulását.

A hőmérsékleti hatás egyik legérdekesebb példáját a *Menidia menidia* nevű tengeri halfaj tanulmányozása szolgáltatta (Conover és Fleisher, 1986). E faj mérsékelt égövi populációiban az ivar szoros összefüggést mutat a szaporodási szezon környezeti hőmérsékletével. A kezdeti alacsonyabb hőmérsékleti körülmények között több nőivarú egyed fejlődik (hosszabb és táplálékban gazdagabb növekedési periódust biztosítva számukra), míg később magasabb hőmérsékleten több a hím egyed. Ezzel szemben az északi területeken, ahol kiegyenlítettebbek a táplálkozási és hőmérsékleti viszonyok és nem származik előny abból, hogy a nőivarú egyedek korábban születnek, minden hőmérsékleten megközelítőleg 1:1 az ivararány (Manning és Kime, 1984; Baroiller és mtsai., 1995).

Más esetekben, mint például az európai tavi teknősnél (*Emys obicularis*) alacsony hőmérsékleten (25Cº) csak hím ivarú egyedek születnek, míg magas hőmérsékleten (30Cº) minden egyed nőivarú. A két határérték közötti hőmérsékleten pedig mindkét ivar megtalálható különböző arányban (Pieau és mtsai., 1994). Ugyanakkor az amerikai alligátor (*Alligator mississippiensis*) esetében mindkét szélső hőmérsékleten (31,5 és 35 Cº) nőivarú egyedek születnek, míg a kettő között mindkét ivar előfordul (33 Cº-on csaknem minden egyed hím), de a teknősöknél is találunk példát

ilyen típusú hőmérsékleti hatásra (Ferguson és Joanen, 1982; Rhen és Lang, 1999).

A TSD-re érzékeny halfajok esetében a hőmérséklet emelkedése az utódcsoport ivararányát többnyire a hímivar irányába tolja el, míg az „optimálisnál" alacsonyabb hőmérséklet az ikrások fejlődését eredményezi (Uguz és mtsai., 2003), de kis számban vannak fajok, amelyeknél fordított irányba történik az eltolódás (Craig és mtsai., 1996.). Bőven akadnak persze olyan fajok is a halak között, amelyeknél a megváltozott hőmérséklet hatására nem találtak kimutatható változást a populácio ivararányában (Eck és Allen, 1993).

A halak és más, vizes környezetben, külső egyedfejlődéssel fejlődő fajok esetében a környezet ivar kialakulásra gyakorolt hatásának ismertetésénél meg kell említeni, hogy nemcsak a populáció összetétele és a hőmérséklet, hanem a különböző vízben oldott anyagok, szennyeződések is hatást gyakorolhatnak a kialakuló ivarára a fajok egy részénél (Hayes, 2002; Kime, 1995; Rubin, 1985).

Egyes halfajoknál például a hőmérséklet hatásához hasonló következmények figyelhetők meg a pH változások hatására is, ahol a magas pH érték a női ivar, míg az alacsony a hímivar felé tolja el a populációk ivararányát (Rubin, 1985). Sok információ utal arra, hogy a különböző környezeti szennyező anyagoknak is (mint például a kommunális és ipari szennyvizeknek, nehézfémeknek, szerves foszfátoknak és szerves klór vegyületeknek, peszticideknek és herbicideknek) van hasonló hatása (Kime, 1995; Sumpter, 1997), amelyek okozhatják az ivar átfordulását, interszexuális gonád fejlődését, ivarspecifikus fehérjék expresszióját, a hím gonád feminizációját, az ivarérés előrehozatalát, vagy késlekedését. Ehhez hasonló hatás érhető el különböző hormonhatású készítményekkel is, amelyeket kontrollált körülmények között a halak ivarátfordítására lehet felhasználni különböző kísérletekben (Pandian és Koteeswaran, 1998; Yamamoto, 1969).

Az itt felsorolt környezeti tényezők azonban – szemben a hüllőknél leírt hőmérsékleti hatással – a halak esetében általában nem az elsődlegesen ivart meghatározó faktorok, de szélsőséges esetekben teljesen átvehetik az ivari fejlődés irányítását az amúgy szabályos hermafrodita, vagy gonokronisztikus fejlődésű egyedekben, az előre meghatározottól eltérő ivar kialakulását okozva (Devlin és Nagahama, 2002).

2.2.2 Genetikai ivardetermináció

A hermafrodíták és a váltivarúak eddig felsorolt környezeti ivardeterminációval rendelkező csoportjainál lényeges, hogy az egyedek genotípusosan semlegesek (egyformák) és az örökletes tényezők szerepe az ivar kialakulásában kevésbé fontos. Az evolució előreheladtával egyre jobban előtérbe kerül a genotípus ivart meghatározó szerepe, megszűnik a genetikai semlegesség is és a két ivar között több-kevesebb genetikai különbség lesző. Az evolucióban „legfejlettebb fajok”, így a gerincesek közé tartozó fajok többsége is váltivarú és elsősorban az ivar kialakulásáért felelős gének kombinációja határozza meg, hogy az egyed milyen típusú gamétákat termel élete során (genetikai ivarmeghatározás). Ugyanakkor a hermafrodita egyedek esetenkénti felbukkanása bizonyítja, hogy a „biszexuális potenciál” ezeknél a fajoknál is megmaradt (Vaiman és Pailhoux, 2000; Zaparackaite és Barauskas, 2003).

A genetikai ivardetermináció legősibb formájának a poligénes ivardetermináció tekinthető, amelynél az ivar(ok) kialakulásáért felelős gének és azok különböző változatainak „konstellációja” határozta meg a kialakuló ivart (Uguz és mtsai., 2003; Lee és mtsai.,2004). Ennél fejlettebb formát képvisel az egyetlen gén irányítása alatt álló ivardetermináció, ami annak következtében alakulhat ki, hogy az ősi, az ivar kialakulásában szerepet játszó géncsoport egy tagja az idők folyamán olyan szerepre tett szert az irányításban, amelyet az egyéb genetikai faktorok már igen kevéssé tudnak befolyásolni. A legelfogadottabb elmélet szerint, amelyet főleg emlős és madár kromoszómák vizsgálata alapján állítottak fel, az ilyen „egy lókuszos” genetikai rendszerek teremtették meg az ivari kromoszómák kialakulásának lehetőségét (kromoszómális ivardetermináció, CSD)

Az ivari kromoszómák egyetlen autoszóma párból fejlődtek ki folyamatos evolúciós változások útján (Graves, 1995). Ez az emlősöknél feltehetően mintegy 240-320 millió évvel ezelőtt kezdődött meg, nem sokkal azután, hogy a madarak és emlősök fejlődése szétvált (Lahn és Page, 1999). A madarak ivari kromoszómái ettől függetlenül alakultak ki, körülbelül 60-100 millió évvel ezelőtt egy másik autoszóma párból (Fridolfsson és mtsai., 1998).

Az elmélet szerint egy autoszómán, amely az ivari fejlődésben szerepet játszó géneket hordozott, kialakult egy ivardetermináló faktor. Ennek következtében az egyik ivar kialakulásához szükségessé vált, míg a

másikat akadályozta. Az ezt követő időszakban az ivar kialakulás folyamatában szerepet játszó gének az evolúciós változások során a kialakuló (ivardeterminálló faktort hordozó) ivari kromoszómákra rendeződtek, aminek következtében azok mind szerkezetükben, mind génkészletükben egyre jobban eltávolodtak egymástól, valamint az autószomáktól (Charlesworth, 1991; Charlesworth, 1996). Ennek az eltávolodásnak az eredményeképpen csökkent, majd egyes szakaszokon szinte eltűnt a kromoszómák közötti homológia és megszűntek a közöttük kialakuló rekombinációs események is (nem rekombinálódó régiók). A rekombináció hiányában az ivardeterminálló faktort hordozó kromoszómán, a mutációk felhalmozódása következtében a nem esszenciális gének degradációja indult meg, míg a két azonos ivari kromoszómát hordozó másik ivarban az ilyen mutációkat a rekombináció eliminálni tudta (Charlesworth, 1991; Quintana-Murci és mtsai., 2001b). Ennek a folyamatnak az egyik következménye az ivari kromoszómák közötti méretkülönbség. Feltételezések szerint a halak esetében ezek a folyamatok az evolúció során számos ponton megindultak és különböző sebességgel zajlottak le. Ennek köszönhetően eltérően differenciálódott ivari kromoszómák találhatók azokban a fajokban, amelyek heterogametikus ivari kromoszómákkal rendelkeznek. A gerincesek törzsén belül e tekintetben a legnagyobb változatosságot talán a halaknál találjuk, ahol szinte az összes lehetséges ivari kromoszóma típus és azok számos kombinációja megtalálható (Devlin és Nagahama, 2002).

A helyzetet tovább bonyolítja azonban, hogy a halaknál a genetikailag meghatározott ivarnak is két különböző formáját írták le. Eszerint a genetikai ivar lehet egy főgén által meghatározott (Peichel és mtsai.,2002), hasonlóan az emlősöknél leírtakhoz, de állhat több gén irányítása (poligénes szabályozás) alatt is (Lee és mtsai.,2004). Az utóbbi csoportban feltételezhetően egy-két elsődleges hatású gén működik, míg az ún. módosító gének közvetve, vagy közvetlenül befolyásolják ezek működését. Több ilyen módosító gén együttes hatása akár felül is bírálhatja az elsődlegesen meghatározott genetikai ivart. Feltételezhetően ennek köszönhető, hogy egyes fajok különböző populációiban az ivararány különböző mértékben eltér a normális 50-50%-tól és generációnként a genetikai hasadás következtében változik (Devlin és Nagahama, 2002). Ennek egyik legjobban tanulmányozott példáját a *Xiphophorus maculatus (Xiphophoridae)* esetében írták le (lásd: 2.2.2.1. fejezet), de szelekciós kísérletek eredményei alapján valószínűsíthető, hogy a gerinces modellállatként használt zebradánió (*Danio rerio*) esetében is ilyen

mechanizmusok döntik el az egyedek ivarát (Bártfai és Orbán, személyes közlés).

Ismereteink a CSD rendszerekről meglehetősen korlátozottak, többnyire csak a kromoszóma rendszer típusok azonosításáig terjednek. Az ivar kialakulását meghatározó molekuláris folyamatok és a bennük szerepet játszó gének csak az emlősök, valamint a kutatások során modellállatként használt ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) és egy fonalféreg a *Caenorhabditis elegans* esetében ismertek, míg más rendszertani kategóriák, illetve fajok esetén viszonylag kevés gén ismert és a közöttük levő homológia limitált (Charlesworth, 1991; Charlesworth, 1996; Gilbert, 2000).

2.2.2.1 Ivari kromoszóma rendszerek

A mendeli genetika újrafelfedezését követően Clarence E. McClung ismerte fel az ivari kromoszómák fontosságát, és számolt be elsőként tudományos publikációban, az X kromoszómák és az ivardetermináció közötti kapcsolatról (McClung, 1902). Elmélete az ivari kromoszómák létezéséről később beigazolódott és mára már tudjuk, hogy a genetikailag meghatározott ivarral rendelkező fajok nagy része rendelkezik ivari kromoszómákkal is, amelyek az ivar kialakulásában irányító szerepet játszó géneket hordoznak.

Az azonosított ivari kromoszómával rendelkező fajoknál, az esetek többségében az ivari kromoszómapárok közötti méretkülönbség (egyes esetekben az egyik kromoszóma teljes hiánya) tette lehetővé az ivari kromoszómák azonosítását. Azoknál a fajoknál azonban, ahol az ivari kromoszómák differenciálódása kezdeti stádiumban van, a különbség kimutatása gyakran nehézségekbe ütközik, vagy csak közvetett módszerekkel lehetséges (Graves, 1995). A gerincesek között is számos olyan faj található, amely kevésbé fejlett, morfológiailag nem, vagy csak nehezen elkülöníthető ivari kromoszómákkal rendelkezik.

Az ivari kromoszómák vizsgálata során, mára több eltérő ivardeterminál mechanizmus vált ismertté. Az egyik ilyen kromoszómális ivarmeghatározási rendszer az úgynevezett dózisfüggő ivarmeghatározás. Ennek egyik legismertebb és legtöbbet vizsgált képviselője az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*). Ennél a fajnál az X kromoszómák autoszóma készlethez viszonyított aránya (dózisa) határozza meg az ivart. Abban az esetben, ha ez az arány 1, vagy annál nagyobb az egyed nőivarú lesz

függetlenül attól, hogy van-e Y kromoszómája (több X kromoszóma esetén kisebb abnormalitások tapasztalhatók), ha pedig 0,5 vagy attól kisebb, akkor az egyed hím ivarú lesz. A 0,5 és 1 közötti arány interszex fenotípusokat eredményez (Bridges, 1925; Gilbert, 2000).

Ugyancsak dózisfüggő ivarmeghatározással rendelkezik egy másik, modellállatként jelenős faj a *Caenorhabditis elegans* (Madl, 1979; Gilbert, 2000), de jelenlegi ismeretek alapján az sem kizárt, hogy a madaraknál is egy ilyen dózisfüggő ivarmeghatarozás van (Ellegren, 2001) és nem a W kromoszómán található(k) az ivart determináló gén(ek) (lásd később). Halaknál is leírtak néhány fajt, amelyeknél XX/XO ivari kromoszómákat figyeltek meg (pl.: *Triacanthus brevirostris*, Choudhury és mtsai., 1982), sőt a *Colisia lalius* és a *Lepidocephalichthys guntata* fajok esetében ZZ/ZO kromoszómarendszert találtak (Rishi, 1976; Sharma és Tripathi, 1988). Általában azonban ezekben az esetekben további vizsgálatok (pl. aneuploid egyedek vizsgálata) szükségesek annak eldöntésére, hogy valóban dózisfüggő ivar-meghatározás működik ezekben a fajokban.

Egy második, alapjaiban eltérő ivari kromoszóma rendszer a komplementer ivarmeghatározás („complementary sex determination", vagy haplodiploidia), amelynek legismertebb képviselői a *Hymenoptera* fajok (hangyák, méhek, darazsak – több mint 30 faj 4 családból) (Holloway, 2000). Itt a hím ivarú egyedek megtermékenyítés nélkül, partenogenetikus petékből fejlődnek ki. Kromoszóma állományukra nézve haploidok (hemizigóták), így csak egy ivari kromoszómával rendelkeznek, míg a nőivarúak megtermékenyített diploid petékből fejlődnek két ivari kromoszómával (Dubinyin, 1977). Azonban azok a diploid egyedek, amelyeknél az ivari kromoszómán található ivart meghatározó lókusz homozigóta formában van jelen, diploid hímekké fejlődnek, amelyek életképtelenek, sterilek, vagy steril triploid utódokat nemzenek (Holloway, 2000; Cook és Crozier, 1995).

A harmadik ivari kromoszóma rendszerrel kapcsolatban a legtöbb ismeretünk a két rendszertanilag legmagasabb osztályból, a madarak és emlősök osztályából származik. E két osztályban a legelfogadottabb nézetek szerint az ivardeterminációs mechanizmusban a főszerepet egy, csak az egyik ivarban jelenlevő kromoszóma (Y vagy W) játssza (heterogametikus kromoszóma rendszer). Ennek jelenléte idézi elő madaraknál a női, míg emlősöknél a hímivar kialakulását, míg hiánya az ellentétes ivari fejlődéshez vezet. E kromoszómák homológ párja (X, vagy Z) normál esetben a heterogametikus ivarban egy, míg a homogametikus ivarban két példányban

van jelen. A méhlepényes emlősök esetében a nőnemű egyedek sejtmagjában a két X kromoszóma közül csak az egyik működik. A másik a maghártyához tapadva erősen festődő, inaktív formában van jelen (ez a Barr-testecske, amely lehetővé teszi a hím és nőivarú szövetek elkülönítését mikroszkópos módszerrel), így a két ivar kialakulása során az X kromoszómás gének dózisában nincs különbség (Lyon, 1961; Charlesworth, 1991; Heard és mtsai., 1997). A madarak esetében ez a jelenség és a kulcsszerepet játszó gének nem ismertek, ezért nem zárható ki, hogy itt a korábban ismertetett dózisfüggő ivarmeghatározás egy változata működik és a W kromoszóma csak asszisztál a nőivar kialakulásához (Ellegren, 2002; Ellegren, 2001).

Fontos megjegyezni, hogy az ismertetett kromoszóma rendszerek nem feltétlenül mutatnak szoros összefüggést a rendszertani kategóriákkal. A madarak és emlősök osztályán belül ugyan egységes a helyzet: míga az előbbieknél homogametikus hímek és heterogametikus nőstények vannak (ZZ/WZ), addig az emlősöknél éppen fordított a helyzet (XY/XX) (Charlesworth, 1991; Quintana-Murci és mtsai., 2001a). Az evolució korábbi fáziasi során kialakult osztályok körében azonban az evolúciósan fejlettebb fajok túlnyomó többségénél talált ivari kromoszómák és kromoszóma rendszerek már nem ilyen egységesek. Így például az kétéltűek *Anura* rendjének 833 fajánál az igen ritka WO/OO (nőstény/hím) típus mellett mind az XX/XY mind a ZW/ZZ ivar-meghatározó rendszer képviselői megtalálhatóak voltak (Schmid és mtsai., 1991), de a rovarok esetében is megtalálható az összes ismertetett ivari kromoszóma rendszer (Bridges, 1925; Holloway, 2000; Cook és Crozier, 1995; Traut és Marec, 1997; Bianchi és Meliado, 1998; Panzera és mtsai., 1996).

A halaknál eddig több, mint ezerhétszáz halfaj kariotípusát határozták meg, de ezek közül mindössze 176 fajban találtak jól elkülöníthető ivari kromoszómákat (Devlin és Nagahama, 2002), melyek között egyaránt előfordulnak hím heterogametikus (XX/XY), illetve női heterogametikus (ZW/ZZ), (az előbbi kétszer olyan gyakori, mint az utóbbi), valamint XX/XO és ZZ/ZO kromoszómákkal rendelkező fajok is. Esetenként ugyanazon családon belül e kromoszóma rendszerek közül több is megtalálható (Balarin, 1979). További érdekesség, hogy 7 nemzetségbe tartozó, a hermafroditizmus valamely vállfaját bemutató 259 faj vizsgálata során 4 esetében találtak ivari kromoszómapárt néhány populációban (Devlin és Nagahama, 2002).

Az ivari kromoszómával rendelkező gerincesek között többségben található a heterogametikus kromoszómarendszer két alaptípusa (XX/XY és

ZZ/ZW), de számos olyan faj is ismert, amelyek ezen típusok többé-kevésbé szokatlan, módosult változtával rendelkeznek. Ezek az esetek többségében valamilyen kromoszóma transzlokáció, inszerció vagy más, az ivardeterminációban fontos szerepet játszó gén mutációja következtében jöttek létre, majd rögzültek a fajban, vagy populációban (Almeida-Toledo és Foresti, 2001). Ilyen példa a módosult ivari kromoszómák között is különleges esetnek számító vörös bőgőmajom (*Alouatta seniculus stramineus, Platyrrhini, Primates*) esete, ahol mind az X mind pedig az Y kromoszómának két típusa alakult ki ($X_1X_2Y_1Y_2/X_1X_1X_2X_2$) egy autoszómális transzlokáció következtében (Lima és Seuanez, 1991).

Egy másik érdekes változatot találtak Eurázsia északi részének uralkodó rágcsálófajánál, a lemmingnél (*Myopus schisticolor* Lilljeborg). Itt az X kromoszóma módosult, így a faj nőstényei között két különböző kariotípus létezik: az X*X és a módosult X*Y (Fredga, 1976). Az X* kromoszómát hordozó embriók az Y kromoszóma jelenlétében is nőstények lesznek, csakúgy, mint az X*X genotípusú testvéreik. Kivételesen előfordulnak X*XY genotípusú egyedek is, amelyek akár hímekké, akár pedig nőstényekké válhatnak aszerint, hogy a mutáns vagy a vad típusú X kromoszóma inaktiválódik bennük (Schempp és mtsai., 1985).

Viszonylag gyakori az Y kromoszóma módosulásával kialakuló XX/XY_1Y_2 típusú ivari kromoszómarendszer, amely megtalálható a rágcsálók *Gerbillinae* alcsaládjában (Volobuev, 1996), az erszényesekhez tartozó mocsári kenguru (*Wallabia bicolor*) esetében (Toder és mtsai., 1997), vagy az indiai muntjac szarvasoknál (Zhang és mtsai., 2001; Pathak és Lin, 1981). Természetesen a halaknál is megtalálható mindkét típusú ivari kromoszóma módosulás. Például a *Coregonus sardinella* (*Salmonidae*; Frolov, 1990) esetében XX/XY_1Y_2 ivari kromoszómatípus található, azonban X_1X_2 típusú kromoszóma módosulások halaknál gyakoribbak (*Hoplias malabaricus; Erythrinidae*: Bertollo és mtsai., 1983; 1997; 1998; *Brachyhypopomus pinnicaudatus Hypopomidae*: Almeida-Toledo és mtsai., 2000; Almeida-Toledo és Foresti, 2001).

Találunk azonban példát halaknál W kromoszóma módosulásra is, így Nakayama és mtsai. (1994) a ZW/ZZ típusú ivari kromoszómákkal rendelkező *Leporinus elongatus* halfajban több olyan hímet azonosítottak, amelyeknek egyik ivari kromoszómája atípusosnak bizonyult. A szerzők az atípusos ivari kromoszómák megjelenését a két ivari kromoszóma közötti rekombináció eredményének tulajdonítják, mely a két klasszikus heterogametikus rendszer közötti átmenet egyik lépésének tekinthető.

Hasonló rendszert írtak le a *Appareiodon affinis* (*Parodontidae;* Moreira-Filho és mtsai., 1980), *Scardinius erythrophthalmus* (*Cyprinidae*; Koehler és mtsai., 1995) és *Trachinocephalus myops* (*Synodontidae*; Ota és mtsai., 2000) fajoknál is .

A legismertebb halfaj, amely különleges ivari kromoszóma rendszerrel rendelkezik a *Xiphophorus maculatus* nem sorolható be az eddigi csoportokba. A *X. maculatus* ikrásai négy (XX, WY, WX és WW), míg tejesei két (XY és YY) különböző ivari kromoszómapárt hordozhatnak (Kallmann, 1973; Kallman, 1984; Kallman és Bao, 1987; Orzak és mtsai., 1980), tehát a két alaprendszer, az XX/XY és ZW/ZZ keveréke határozza meg az egyedek genotípusos ivarát. Ezzel a rendszer eddigi ismereteink szerint egyedülálló a maga nemében.

2.2.2.2 Az ismert ivari kromoszómák fő jellegzetességei

Az ivari kromoszómákról rendelkezésünkre álló információk sok esetben olyan jellegzetességeket mutatnak, amelyek a kromoszómális rendszerektől függetlenül is jellemzik az ivari kromoszómákat és számos párhuzam felállítására adnak lehetőséget. Így például az emlősök, kétéltűek és a *Drosophila* esetében is több publikáció azt sugallja, hogy az ivarhoz kötött funkciók sokkal gyakrabban öröklődnek az X kromoszómán, mint az várható lenne (Hurst, 1999; Wang, 2001; Graves, 2000). Érdekes módon azonban nem csak az ovárium fejlődésében szerepet játszó gének, hanem az ivarsejtek fejlődésében és a spermatogenezisben szerepet játszók, vagy a szexuális orientációért felelősek is. Jóllehet ezeken kívül számos más, az ivartól független testi sajátosságokért felelős gént is azonosítottak rajta a különböző fajokban (Hurst, 1999; Wang, 2001; Graves, 2000).

A legtöbb információnk az ember X kromoszómájáról van, amelyre eddig mintegy 764 ismert gént térképeztek fel, és további 464 létezését jelezték előre a humán genom project szekvencia vizsgálatai alapján (az Ensembl molekuláris adatbázis 2004. szeptember 10. adatai szerint; http://www.ensembl.org). Ugyanakkor ezek a számok korántsem tekinthetők véglegesnek, hiszen a szekvenciák elemzése még folyik és mérete alapján (150 Mb) akár 3-4 ezer gén is jelen lehet ezen a kromoszómán (Graves, 2000).

Az X kromoszómával szemben az emlősök Y kromoszómája jelentősen degradálódott, hossza megközelítőleg 60Mb, ami az emberi

genom 2%-át reprezentálja (Quintana-Murci, 2001b). A humán genom project vizsgálatai szerint mindössze 81 ismert gén helyezkedik el rajta, és szekvenciák vizsgálata alapján csak további 79 létezését feltételezik (az Ensembl molekuláris adatbázis 2004. szeptember 10. adatai szerint; http://www.ensembl.org).

Az Y kromoszóma az összes emlős, valamint feltehetően számos kétéltű és hal esetében a hímivar kialakulását determináló és ezáltal a nőivar kialakulását gátló faktort hordoz. A Drosophilában ezek a tényezők ugyan az autoszómákon találhatók meg, de az Y kromoszóma jelenléte itt is feltétlenül szükséges a hím ivarjelleg zavartalan kifejlődéséhez (McElreavey, 1993; Gilbert, 2000). Az Y kromoszóma kialakulása során az eredetileg rajta található gének nagy része elveszett, vagy más kromoszómára helyeződött át. Két pszeudoautoszómális (rekombinálódó) régióval rendelkezik, amelyek homológ párja megtalálható az X kromoszómán. A két kromoszóma ezen részei között rekombináció is végbemehet.

A két pszeudoautoszomális régió egy nem rekombinálódó régiót zár közre, amely embernél a kromoszóma 95%-át teszi ki. Az itt található gének nagy részének már nincs felismerhető homológ párja az X kromoszómán. Ugyanakkor számos a hím ivar fejlődésében fontos szerepet játszó gén található itt, amelyek mutációja azoospermiát (a spermiumok hiányát), vagy sterilitást okoz (Quintana-Murci, 2001b; Lahn és Page, 1997). Közülük némelyikről bizonyítható, hogy autoszómáról került az Y kromoszómára az evolúció során. Ezek mellett azonban vannak mindenütt expresszálódó, ún. háztartási gének is ebben a régióban (Lahn és Page, 2000).

Az Y kromoszómák sajátosságai között sorolható fel, hogy a nem rekombinálódó régió szekvenciájában változást csak a mutációk okoznak, ezek pedig generációról generációra változás nélkül adódnak tovább, minden hím egyedben megtalálhatóak, és így arra is alkalmasak, hogy rokonsági, származási és migrációs vizsgálatokat végezzenek segítségükkel a mutációk száma és típusa alapján (Underhill és mtsai., 2000).

Lényegesen kevesebbet tudunk a madarak ivari kromoszómáiról, bár az emlősökhöz hasonlóan itt is nagy méretbeli különbséget találunk (kivéve a lapos-mellű futómadaraknál; *Ratitae*). Található rajtuk egy pszeudoautoszómális, valamint egy nem-rekombinálódó szakasz is (Solari és mtsai., 1988). Azonban az összehasonlító genetikai térképek alapján bizonyítható, hogy nem ugyanabból az autoszóma párból alakultak ki, mint az emlősöké (Nanda és mtsai., 2000). Nem ismert az sem, hogy a Z

kromoszóma autoszómákhoz viszonyított arányának, vagy a W kromoszómának van-e döntő szerepe az ivar meghatározásában. Eddig ugyanis nem sikerült aneuploid sex kromoszómával rendelkező egyedeket találni, illetve előállítani (Fridolfsson és mtsai., 1998; Ellegren, 2000; Graves, 2003), mindössze egyetlen publikáció számol be olyan mikroszatellit vizsgálatokról, amelyek egy ZZW ivari kromoszómákkal rendelkező nőivarú, nagy nádi poszátát (*Acrocephalus arundinaceus*) azonosítottak (Arit és mtsai., 2004). Ez az eredmény azonban erősen sugallja egy, a W kromoszómán található ivar determináló gén jelenlétét.

A W kromoszóma szerkezetében sok hasonlóságot mutat az Y kromoszómával. Mivel szintén erősen degradálódott, heterokromatikus régiókban gazdag és kevés gént hordoz (Ellegren és Carmichael, 2001). Időközben a tyúk genom projekt előzetes adatai is elérhetővé váltak, amelyben az eddig ismert szekvenciák alapján, a W kromoszómán mintegy 44 ismert gén találtak, és további 474 jelenlétét feltételezik (az Ensembl molekuláris adatbázis 2004. Szeptember 10. adatai szerint; http://www.ensembl.org). Korábban mindössze négy gént térképeztek ide a nem rekombinálódó régióba, ezek mindegyiknek létezik homológ párja a Z kromoszómán (Schmid és mtsai., 2000; Ellegren, 2002). Közülük az egyik (ASW; Avian Sex-specific W-linked) csak a nőivarban expresszálódik, ezért feltételezhető, hogy ennek igen fontos szerepe van az ivardeterminációban (O'Neill és mtsai., 2000). Egy másik fontos új gén a FET-1, melyet hím- és nőivarú gonád expressziós különbségeinek vizsgálata során azonosítottak, és szintén csak a nőivarban expresszálódik. A gén cDNS-ével végzett FISH kromoszóma hibridizációs vizsgálatok során pedig csak a W kromoszómán találtak fluoreszcens festődést (Reed es Sinclair, 2002). Ez az eredmény szintén azt sugallja, hogy a W kromoszómán található ivar determináló faktor.

A Z kromoszóma egy közepes méretű kromoszóma, amely a tyúkban 7-10%-át adja a teljes genomnak. A tyúk genom projekt előzetes adatai szerint ugyancsak 44 ismert gén találtak eddig a Z kromoszómán, de csak további 330 jelenlétét feltételezik (az Ensembl molekuláris adatbázis 2004. Szeptember 10. adatai szerint; http://www.ensembl.org). Ezt megelőzően 28 gént térképeztek erre a kromoszómára (Schmid és mtsai., 2000), amelyek homológjai a legtöbb esetben az ember 9-es kromoszómáján találhatók (Nanda és mtsai., 2000). Ezek túlnyomórészt háztartási gének, azonban itt található meg a DMRT1 gén is, amely az emberben, a *Drosophila melanogaster*-ben és a *Caenorhabditis elegans*-ban is csak a hímivarban, a

herében expresszálódik (Schmid és mtsai., 2000; Fridolfsson és mtsai., 1998).

2.2.3 Az ivardeterminációs rendszer azonosításának módszerei a halaknál

2.2.3.1 Klasszikus eljárások

A halak ivardeterminációjáról közvetett információt szerezhetünk a kontrollált környezeti körülmények között végzett egyedi keresztezésekből származó utódok fejlődésének és a populációk ivararányának nyomon követésével. A különböző fejlődési stádiumokban és életkorokban, valamint mesterségesen alakított szociális környezetben végzett ivarvizsgálatokkal lehetőség van a szinkronizált és szekvenciális hermafroditizmus azonosítására, és jellemzésére.

Ha az ivararány az 1:1-től jelentősen eltérő és/vagy egyedi keresztezésenként változik akkor az polifaktoriális ivarmeghatározás, vagy környezeti befolyás jelenlétét valószínűsítik, amelyek elkülönítése csak összetettebb keresztezési és kontrollált környezet-vizsgálati kísérletekkel lehetséges (Devlin és Nagahama, 2002).

Ha az ivararány nem különbözik szignifikánsan az 1:1-től és a környezeti hatásokat kizárhatjuk, akkor nagyon valószínű, hogy az egy génen alapuló ivarmeghatározással van dolgunk, ám ez nem jelenti feltétlenül azt, hogy az adott faj rendelkezik ivari kromoszómával (Devlin és Nagahama, 2002).

Az ivari kromoszómák azonosítása már nem ilyen egyszerű, mivel sok halfaj esetében nincs közöttük jelentős morfológiai különbség. Az azonosított ivari kromoszómával rendelkező fajoknál az esetek többségében méretkülönbség (extrém esetekben az egy kromoszóma teljes hiánya) figyelhető meg, míg ritkábban csak a kromoszómák heterokromatikus szerkezetében, vagy festődésében lehet eltérés (Phillips és Reed, 1996; Ozouf-Costaz és mtsai., 1990).

A nehezen elkülöníthető ivari kromoszómákkal rendelkező fajoknál más vizsgálatokkal, indirekt módon lehet megkísérelni a heterogametikus ivar (ivari kromoszóma rendszer) kiválasztását. Ezt teszik lehetővé a halak

és kétéltűek esetében (Yamamoto, 1955; Golovinskaya, 1968; Richards és Nace, 1978; Elinson, 1983; Horváth és Orbán, 1995; Wallace és mtsai., 1999) végrehajtható genommanipulációs eljárások (in vitro fertilizáció, az ivarsejtek genomjának inaktiválása, a második poláros test kiválásának, illetve az első mitótikus osztódás gátlása, valamint a hormonális ivarátfordítás), amelyek más rendszertani kategóriába tartozó fajoknál nem, vagy csak igen nehezen alkalmazhatóak. Ezekkel a módszerekkel lehetőség nyílik gynogenetikus (csak anyai örökítő anyagot hordozó), vagy androgenetikus (csak apai eredetű örökítő anyagot hordozó) egyedek létrehozására is (Horváth és Orbán, 1995; Pandian és Koteeswaran, 1998).

Gynogenezis esetén a zigóta fejlődését általában inaktivált genomú, vagy heterospecifikus spermium felhasználásával indítják be. A spermium genomjának inaktivációja UV, gamma, vagy röntgen sugárzással, illetve kémiai mutagénekkel (dimetil-szulfát, toluidin kék) végezhető el. Ezek megfelelő dózisban csak az örökítő anyagot teszik irreverzibilisen tönkre a többi sejtalkotót nem. Ezt követően a zigóta diploid szintje a második poláros test kiválásának, vagy a zigóta első osztódásának gátlásával visszaállítható. Az előbbi esetben meiotikus gynogéneket kapnak, amelyek nem homozigóták, mivel a petesejt haploid genomja és a második poláros test a kromoszómák véletlenszerű szétválása és a rekombinációk következtében nem egyforma. A második esetben kapott ún. mitotikus gynogének teljesen homozigóták, mivel egy haploid genom megduplázásával jönnek létre (review: Horváth és Orbán, 1995; Pandian és Koteeswaran, 1998).

Az androgenezis a gynogenezis „fordított párja”. Ugyanis ebben az esetben a petesejt genomját semmisítik meg és a termékenyítéskor bejutó spermium genomjának megduplázásával (az első osztódás gátlásával) érik el a homozigóta diploid állapotot (review: Horváth és Orbán, 1995; Pandian és Koteeswaran, 1998).

A gynogenetikus és az androgenetikus egyedek ivarának fenotípusos meghatározásával közvetlenül is levonhatunk következtetéseket az ivari kromoszóma rendszerre vonatkozóan. A homogametikus ivarú (XX, ZZ) szülő gynogenetikus, vagy androgenetikus utódainak ivara minden esetben megegyezik a szülő ivarával. A heterogametikus (XY, WZ) szülőktől 50%-ban hím (YY, ZZ) és 50%-ban nő (XX, WW) ivarú utódok születnek, feltéve, hogy az X vagy Z kromoszóma nem hordoz olyan faktorokat, amelyek mindkét ivar fejlődéséhez szükségesek és valamennyi genotípus életképes. Az így létrehozott egyedek normál társaikkal végzett keresztezése

során az androgenezissel létrehozható YY kromoszómás „szuper hím”, illeteve a gynogenezissel létrehozható WW kromoszómás „szuper nő” egyedek utódai ismét csak 100%-ban azonos ivarúak lesznek a genommanipulált szülővel.

A gynogenetikus és az androgenetikus kísérletek nagy százalékban eredményeznek váratlan ivarányt a létrehozott állományokban. Ennek többféle magyarázat is lehetséges. A fentebb ismertetett életképtelen genotípusok mellett okozhatja az inaktiválni kívánt genom szennyezése, modifikáló gén(ek) hatása, a genom-donor ivarátfordult volta, sőt még környezeti tényezők is közrejátszhatnak a szokatlan ivarányok kialakításában (Horváth és Orbán, 1995; Pandian és Koteeswaran, 1998).

Egy másik lehetőség a hormonális ivarátfordítás (vagy hermafroditák előállítása), ami a halak többségénél mindkét irányban előidézhető (a maszkulanizációhoz általában 17α-metil-tesztoszteront, míg a feminizációhoz 17β-ösztradiolt, vagy dietilsztilbösztrolt használják). Ezzel a módszerrel mindkét ivarban vizsgálható az ivari kromoszómák szegregációja, azonban itt a kezelt egyedek ivara nem szolgáltat közvetlenül információkat, csak normál egyedekkel történt keresztezést (Horváth és Orbán, 1995; Pandian és Koteeswaran, 1998) követően az utód populáció ivarányainak elemzéséből következtethetünk az ivari kromoszóma rendszerre.

E módszereken kívül az ivarhoz kapcsolt markerek (nemhez között pigment gének, fehérje vagy DNS polimorfizmusok) öröklődésének vizsgálatával nem csak az ivarok, hanem az ivari kromoszóma rendszerek azonosítására is lehetőség van, megfelelő genotípusú egyedekkel végzett célpárosításokkal.

2.2.3.2 Ivarhoz kötött tulajdonságok, enzimek és gének

Az állattenyésztés gyakorlatában az ivarok elkülönítésére és vizsgálatára először nemhez kötött jellegeket használtak olyan fajoknál, vagy olyan életkorban, amikor a két ivar elkülönítése más módon nem lehetséges.

A nemhez kötött jellegek egy részét autoszómákon öröklődő gének határozzák meg, de az ivarok eltérő fejlődése következtében fenotípusosan csak az egyik ivarban jelennek meg. Egy másik csoportot képeznek azok a

tulajdonságok, amelyeket egy, az adott fajban az ivari kromoszómák valamelyikéhez kötött gén határoz meg. Ezek aszerint, hogy az adott gének az ivari kromoszóma mely részén helyezkednek el, további két csoportra oszthatók. Az egyiket azok a gének alkotják, amelyek az ivari kromoszómák nem rekombinálódó régiójában vannak (vagyis az ivari kromoszómák között kicserélődésük nem lehetséges), míg a másik csoport tagjai a homológ, vagyis a rekombinálódó régióban lokalizálódnak.

Az első ilyen ivari kromoszómán öröklődő tulajdonság az ecetmuslica fehér szemszíne volt, amelyet a white (w) gén öröklődésmenetének vizsgálatával írt le Thomas Hunt Morgan, megfejtve ezzel az ivari kromoszómákhoz kötött gének jellemző öröklődésmenetét is (Morgan, 1910). Számos más fajnál használták fel ezt az öröklődésmenetet a gazdasági gyakorlatban is az utódok nemének előrejelzésére.

Halakban a nemhez kötött öröklődéssel kapcsolatos első megfigyelések a különböző pigment génekkel voltak kapcsolatosak (*Poecilia reticulata, Oryzias latipes, Xiphophorus variatus, X. xiphidium, X. couchianus, X. milleri, X. montezumae cortezi*, *X. maculatus*, (Yamamoto, 1969)). A kérdéses fajokból a színt meghatározó gének többségét azonban mindmáig nem azonosították.

A technikai fejlődés előrehaladtával a figyelem egyre inkább a biokémiai, majd a molekuláris vizsgálatok felé fordult, aminek következtében néhány enzimről sikerült kimutatni, hogy halakban nemhez kötött öröklődést mutatnak. Például Gellmann és mtsai. (1987) szivárványos pisztrángot (*Onchorhynchus mykiss*) vizsgálva azt találták, hogy a hexozaminidáz enzim lókusza (HEX-2) kapcsoltságot mutat "az ivardeterminál ó" lókusszal. Később ugyanez a szerzőhármas bizonyította, hogy a HEX-2 lókusz a szuperoxid dizmutáz enzim lókuszával is kapcsolt (Allendorf és mtsai., 1994). A *Salvenius fontinalis* és *S. alpinus* hibridjének genomját vizsgálva leírták, hogy a tejsav dehidrogenáz-1, az aszpartát aminotranszferáz-5 és a glükózfoszfát izomeráz-3 izoenzimek ivari kromoszómához kapcsoltak (May és mtsai., 1989).

A DNS-szintű vizsgálatok eredményeként is bővültek ismereteink a halak ivari kromoszómáin lokalizálható markerekről. Így például Devlin és mtsai. (1991; 1994) *Oncorhynchus tshawytscha* ("chinook salmon", *Salmonidae*) genomjából izolálták az OtY1 DNS markert, amely Y kromoszómához kötöttnek bizonyult. Nakayama és mtsai. (1994) az ún. "szubtraktív klónozás" módszerével két ivarspecifikus próbát izoláltak

Leporinus elongatus genomjából, melyek közül az egyik mind a Z, mind pedig a W, míg a másik csak a W ivari kromoszómához hibridizált. Forbes és mtsai. (1994) az *Oncorhynchus kisutch*-ban ("coho salmon", Salmonidae) vizsgálták a növekedési hormon (GH) gének harmadik intronjának polimorfizmusát PCR reakcióval. Kiderítették, hogy a GH-2 gén *b* allélje csak hímekből mutatható ki és az "ivardeterminál" (SEX) lókuszhoz kapcsolt. Az 5S riboszómális RNS egyik génjéről is sikerült bizonyítani, hogy szivárványos pisztrángban az X kromoszómára lokalizálható, mégpedig abba a heterokromatikus régióba, amely segítségével a citológusok az X és Y kromoszómákat elkülönítik (Moran és mtsai., 1996). A medaka (*Oryzias latipes*) esetében is izoláltak egy ivarspecifikus szekvenciát, amely segítségével később azonosították a szex kromoszómákat is (Matsuda és mtsai., 1997; 1998).

Az utóbbi két évtized során számos olyan gént és DNS markert azonosítottak, amelyek hüllőkben, emlősökben, erszényesekben, madarakban és a már említett, modellállatként használt *Drosophila melanogaster*, illetve *Caenorhabditis elegans* esetében bizonyultak ivarspecifikusnak, de egyik sem bizonyult általánosan alkalmazhatónak az adott osztály (gyakran rend, család vagy csak faj) keretein túl. A két gerinctelen faj, illetve az emlősök esetében azonosították az ivar kialakulásában kulcsszerepet játszó géneket is, amelyek sok esetben autoszómálisan öröklődnek, és csak az őket irányító elsődleges „kapcsolók” találhatók az ivari kromoszómákon (Gilbert, 2000; Parkhurst és Meneely, 1994; Rhind és mtsai., 1995; Goodwin és Ellis, 2002; Sinclair és mtsai., 1990, Koopman és mtsai., 1991; Kent mtsai., 1996; Arango, 1999; Werner, 1996; Zanaria és mtsai., 1994).

Halak esetében a más fajokban azonosított gének és markerek többsége nem bizonyultak ivarhoz kötöttnek, jelezve, hogy az adott szekvencia nem általánosan szex kromoszómához kapcsolt az állatvilágban, vagy csak az evolúció későbbi szakaszában lokalizálódtak az ivari kromoszómán. Egy ilyen markert izoláltak egy kígyófaj W kromoszómájáról. Az izolált repetitív elemről a *Bkm*-ről, később kiderült, hogy madarakban, emlősökben, sőt Drosophilában is ivari kromoszómához kötött és fő komponense a GA(T/C)A szekvencia ismétlődése (Singh és mtsai., 1979). Az ismétlődő szekvenciát tartalmazó próbával végzett Southern-hibridizációval guppiból (*Poecilia reticulata*) sikerült ugyan ivarspecifikus szekvenciákat kimutatni, azonban sem *X. maculatus*-ból, sem pedig szivárványos pisztrángból nem (Lloyd és mtsai., 1989).

Az emlősök ivarhoz kapcsolt, illetve az ivar kialakulásában szerepet játszó génjei közül az *Sry* (Tiersch és mtsai., 1991), a *Zfy* (Fukada és mtsai., 1995; Husebye és mtsai., 1994; Bull és mtsai., 1988), és a *Sox9* gének (Chiang és mtsai, 1998; Chiang és mtsai, 2001) homológjait izoláltak sikerrel különböző halfajokból, stb. A homológok közül azonban egyik sem ivarhoz kötött.

Jelenleg az egyetlen gén, amely homológjai a *Drosophila melanogaster*-ben (*Dsx*), *Caenorhabditis elegans*-ban (*mab3*) és gerincesekben is megtalálható (madaraknál az X kromoszómán), és tudottan fontos szerepet játszik az ivari fejlődésben a *Dmrt1* (Raymond és mtsai., 1998). Halaknál tilápiából és szivárványos pisztrángból izoláltak homológokat, amelyek a két ivarban eltérően expresszálódnak. Tilápiában a hímek ivarspecifikusan expresszálják a *tDMRT1* gént, míg egy másik homológ (*tDMO*) nyilvánul meg az ováriumban (Guan és mstai., 2000). A szivárványos pisztráng heréjében 10-szer nagyobb expressziót mutatott az *rtDMRT1*, mint az ováriumban (Marchand és mtsai., 2000). Azonban egyik fajban sem az ivarhoz kötötten öröklődnek a felsorolt gének (Guan es mstai., 2000; Marchand és mtsai., 2000). Ugyanakkor a *Oryzias latipes*-ből izolált *DMRT1* homológok egyike (*DMY*) az Y kromoszómán öröklődik (Matsuda és mtsai., 2002), és meghatározó, noha nem kizárólagos szerepet tölt be az ivarmeghatározásban (Nanda és mtsai, 2003; Swain, 2002). A DMY az első azonosított ivardeterminál faktor halakban, ez annak ellenére fontos felfedezés, hogy más halfajokban nem található meg az ivarhoz kapcsolt, elsődleges kapcsolóként működő DMRT1 homológ (Kondo és mtsai., 2003; Schartl, 2004).

2.2.4 Ivardetermináció a harcsaféléknél

A halak az ivar kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok tekintetében a gerincesek közül talán a legváltozatosabb osztály. Ha az egyes családokban vizsgáljuk a szaporodási formák megoszlását, akkor azt találjuk, hogy gyakran egy családon belül megtalálhatók „protandrous”, „protogynous”, szinkronizált hermafrodita és gonokronisztikus fajok is. A fajok legtöbbje genetikailag meghatározott ivarral rendelkezik (Price, 1984).

A harcsafélék ivardeterminációjával kapcsolatos ismereteink a modellállatként használt halfajokhoz viszonyítva meglehetősen korlátozottak, annak ellenére, hogy egyes fajok, mint például az *Ictalurus punctatus*, vagy a *Clarias gariepinus* viszonylag gyakran szerepelnek tudományos munkákban.

Ezidáig a harcsafélék rendjébe tartozó mintegy 34 család több, mint 2500 fajából mindössze 12 családban végeztek citológiai vizsgálatokat, összesen 36 fajon. A vizsgált fajok, akárcsak általában a halak itt sem mutattak egységes képet az ivari kromoszómák tekintetében. Tíz esetben nem találtak differenciálódott ivari kromoszómákat, míg 9 esetben XY típusú, 17 fajnál pedig ZW kromoszóma rendszert azonosítottak (Devlin és Nagahama, 2002).

Gynogenetikus, androgenetikus és ivarátfordított egyedek, valamint utódaik vizsgálatai alapján további két harcsafajban XY (Liu és mtsai., 1996b; Goudie és mtsai., 1995; Bieniarz és mtsai, 1997) kromoszómákat írtak le. Az általunk is vizsgált *Clarias gariepinus* esetén pedig a heterogametikus ivari kromoszómák mindkét változatát feltételezték. Liu és Yao (1995) hormonális (17-α-metiltesztoszteron) kezeléssel a hím ivarfejlődés irányba eltolt hermafrodita egyedek önmegtermékenyítését követően csak nőivarú egyedeket kaptak. Egy másik kísérletben (Liu és mtsai., 1996b) hormonális ivarátfordítással létrehozott ikrás (17-β-ösztradiol) egyedeket normál hímekkel keresztezve 3:1 arányban kaptak hím egyedeket, illetve szintén 17-α-metiltesztoszteron segítségével átfordított tejes egyed, normál ikrás egyedekkel keresztezve szintén teljesen nőivarú állományt eredményezett. Ugyanakkor Galbusera és mtsai. (2000) mitotikus gynogenezissel (lásd 2.2.3. fejezet) létrehozott egyedek között nem találtak olyan hímeket, amelyek valóban gynogenetikusnak bizonyultak (nem hordoztak apai eredetű DNS-t). Ezek a kísérleti eredmények egyöntetűen az XX/XY kromoszóma rendszer jelenlétére utalnak. Mások ettől eltérően a ZZ/ZW kromoszóma rendszer jelenlétét valószínűsítik. Váradi és mtsai. (1999) egy mitotikus gynogenezissel létrehozott állományban 43% ikrás és 57% tejes egyedet találtak. Ugyancsak a női heterogametikus rendszer jelenlétét látszanak megerősíteni Ozouf-Costaz és mtsai. (1990) által a faj nőivarú egyedeiben talált heteromorf kromoszómapár jelenléte is, amelyet a közeli rokon *Heterobranchus longifilis* (*Clariidae*) fajban és a két faj hibridjében is megtaláltak (Teugels és mtsai., 1992).

A harcsafélék családjai közül csak a *Mochokidae* családban van az eddig vizsgált 10 fajban egységes ZW kromoszóma rendszer (Agnese és mtsai, 1990), míg a többiben többféle ivari kromoszóma rendszert írtak le (így például a *Clariida*e családban is), vagy a vizsgált fajok egy részében nem találtak elkülöníthető ivari kromoszómákat (Devlin és Nagahama, 2002).

Ivardetermináció szempontjából a harcsa fajok közül a legtöbb információnk a csatornaharcsától (*Ictalurus punctatus*) származik, melyben Liu és mtsai. (1996a) bizonyították az Y kromoszóma jelenlétét. A glükózfoszfát izomeráz-B (GPI-B) enzim fehérjepolimorfizmusainak vizsgálata során heterozigóta hímek és homozigóta nőstények keresztezésekor találtak szoros korrelációt a tejesekben előforduló izoforma és a hím ivar között, ami alapján feltételezték, hogy az az "ivart determináló" génnel egy kapcsoltsági csoportba tartozik. Más, az emlősöknék Y kromoszómán öröklődő gének homológjai ugyanakkor (lásd: 2.2.3.1.) ennél a halfajnál sem az ivari kromoszómán öröklődnek (Tiersch és mtsai., 1992). Munkámmal párhuzamosan e faj mikroszatellit géntérképét is elkészítették, amelyen hét ivarhoz kötött mikroszatellit található, ezek az U6-os kapcsoltsági csoportra térképeződnek (Waldbieser és mtsai., 2001). Ugyanennél a fajnál vizsgálták a hőmérséklet ivari fejlődésre gyakorolt hatását, amely más halfajokhoz hasonlóan itt is megmutatkozott (lásd: 2.2.1. fejezet), az ivar kialakulásának időszakában. A magasabb hőmérséklet itt az ikrások irányába tolja el a populáció ivararányát (Patino és mtsai., 1996).

Hermafrodita növendékekről mindössze egy faj, a *Heteropneustes fossilis* esetében számoltak be (Saxena és Bhatia, 1977), bár mesterségesen más fajok, így a *Clarias gariepinus* esetében is létrehozhatók fertilis hermafrodita (interszex) egyedeket (Liu és Yao, 1995).

2.3 GENETIKAI MARKEREK

Az elmúlt 20-30 évben a molekuláris biológia és biotechnológia rendkívül gyors fejlődésen ment keresztül. Ennek eredményeként olyan új technikák és módszerek születtek, amelyek nagymértékben felgyorsíthatják, az állattenyésztés, és ezen belül a haltenyésztés fejlődését is. Ennek a folyamatnak egyik fontos lépése a gyakorlat számára hasznosítható genetikai markerek fejlesztése.

A genetikai markerek olyan „jelek”, melyek segítséget nyújthatnak a genomok megismerésében, lehetővé teszik a meglévő genetikai változatosság felmérését, a különböző tulajdonságok öröklődésének nyomonkövetését, egyedek, családok vagy populációk örökítőanyagának analízisét. A genetikai markerek egyik csoportját a fenotípusos tulajdonságok (pl. testforma, szín, pikkelyezettség, stb.) képezik, míg másik csoportot a genotípushoz kapcsolt molekuláris markerek jelentik. Ez utóbbi további két nagy csoportra osztható a fehérje-, valamint a DNS markerekre (összefoglalásként lásd: Orbán, 2000, Varga, 2000).

A fenotípusos markerek száma limitált és a változataik száma is alacsony, sőt a felhasznált tulajdonságok gyakran szoros kapcsoltságot mutatnak egymással. Ezenkívül a környezeti tényezők is sokszor befolyásolhatják a fenotípus megjelenését, ami csökkenti a morfológiai markerek megbízhatóságát. A fenti okok miatt a fenotípusos markerek által nyerhető genetikai információ korlátozott. Ezen felismerésnek köszönhetően a 50-60-as években a biokémiai markerek csoportjába tartozó izoenzim és más polimorf fehérje markerek terjedtek el. Ezekből szintén kevés ismert, kifejlesztésük, illetve kimutatásuk pedig munkaigényes. Nagy előnyük viszont, hogy rendszerint kodominánsan öröklődnek és gyakran már a fejlődés kezdetén is kimutathatóak (Markert és Moller, 1959).

A genetikai markerek alkalmazásában az igazi forradalmi változás a 80-as évek elején kezdődött, amikor a DNS markerek kifejlesztése révén az örökítőanyag közvetlen vizsgálata vált lehetővé.

A DNS markereknek számos előnyös tulajdonsága van a fenotípusos és fehérje markerekkel szemben. Így például számuk jóval nagyobb, mivel markerek létrehozása céljából a genomok valamennyi allélja, polimorfizmusa felhasználható, amelyek a kódoló és nem kódoló régiókat egyaránt reprezentálják. További előny, hogy a DNS szekvenciák fajok között és fajon belül is nagyfokú variabilitást mutatnak, miközben kimutathatóságukat a környezeti és episztatikus hatások nem befolyásolják (összefoglalásként lásd:Orbán, 2000; Varga, 2000).

A DNS markerek közül korábban a markerspecifikus próbával végzett hibridizáción alapuló RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), az utóbbi évtizedben pedig a PCR-alapú technikák terjedtek el. A polimeráz láncreakció (PCR) napjaink molekuláris biológiájának egyik legforradalmibb "újítása", amelynek lényege, hogy a DNS egyes szakaszait szelektíven sokszorozzák fel egy hőforrásokban élő baktériumból, a *Thermophylus aquaticus*-ból izolált hőstabil Taq DNS polimeráz enzim segítségével (Saiki és mtsai., 1985; Mullis és Faloona, 1987). Ez a felfedezés számos új markertechnika kidolgozását tette lehetővé, amelyek az eddig ismertetett genetikai markereknél sok tekintetben előnyösebbek. Ebben a dolgozatban csak a munkám során felhasznált PCR alapú markerek és felhasználásuknak lehetőségei kerülnek bemutatásra.

2.3.1 A RAPD markerek és felhasználási lehetőségeik

Két munkacsoport - egymástól függetlenül - azonos elven működő PCR alapú technikát dolgozott ki, amelyet szinte egyszerre írtak le 1990-ben.

Williams és mtsai. (1990) a „Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD;), míg Welsh és McClelland (1990) az „Arbitrarily Primed PCR” (AP-PCR) nevet adták a módszernek, amelyben ismeretlen DNS szakaszokat sokszorozunk fel, egyetlen primert használva a genom számos pontjáról egy PCR reakcióban. A primerek rendszerint mindössze 10 bp hosszúságú (az AP-PCR esetén hosszabb) random szekvenciák (amelyek GC tartalma 50 és 80 % közötti és palindrom szakaszokat nem tartalmaznak). A feltapadási hőmérsékletet szándékosan alacsonyra (35-40 ^{o}C) állítva elérhető, hogy a primer a genom több száz pontján feltapadjon. Ezen feltapadási pontok közül azonban csak azok eredményeznek detektálható mennyiségű kettősszálú DNS terméket, amelyekkel szemben megfelelő közelségben (ált. max 1,5-2 kb) az ellenkező szálon is talál kapcsolódási helyet. Egyetlen RAPD reakcióban legtöbbször 2-10 fragmentum amplifikálható, amelyek mérete általában 200 és 3000 bp között változik. A reakcióban keletkezett termékeket agaróz gélen elválasztva egy fragment sorozathoz jutunk (amelyben előfordulhatnak az egyedre, a fajra, az ivarra, vagy más tulajdonságra jellemző fragmentek is). A különböző genotípusok mintázataiban látható polimorfizmusokat (bizonyos fragmentek hiánya), vagy a primerkötőhelyeken, vagy az amplifikált régióban meglévő különbségek (deléciók, inszerciók és inverziók) eredményezik (Orbán, 2000; Dinesh, 1993). Néhány száz primer alkalmazásával a genom több ezer pontjáról amplifikálhatunk fragmenteket, ami genotípusos vagy fenotípusos tulajdonságok alapján csoportosított DNS-ek összehasonlító vizsgálatánál elégséges lehet valamely tulajdonságra specifikus markerek izolálásához.

A technika előnye, hogy kivitelezéséhez nem szükségesek a vizsgált genom szekvenciájának részletes ismerete, széles körben alkalmazható, mivel ugyanazon véletlenszerűen kiválasztott primerek bármely halfajból, sőt más fajokból (állatokból, növényekből, gombákból) izolált DNS-en is működhetnek. A reakciók kivitelezése egyszerű, a kimutatás nem igényli izotóp használatát és a többi molekuláris eljáráshoz viszonyítva lényegesen olcsóbb. Ugyanakkor viszonylag gyorsan lehet vele eredményekhez jutni. Mintaigénye rendkívül kicsi (10-40 ng/reakció), így szükség esetén pár hetes, vagy annál fiatalabb ivadékokból is nyerhető néhány reakcióra elegendő DNS az egyed elpusztítása nélkül. A kapott eredmények a reakciókörülmények szigorú állandóságát biztosítva (felhasznált anyagok mennyisége, minősége, reakció hőmérséklete, hűtés-fűtés sebessége) viszonylag jól reprodukálhatóak (Benter és mtsai., 1995).

Más molekuláris markerekkel szemben ugyanakkor hátránya, hogy legtöbbször a RAPD domináns-recesszív öröklésmenetet mutató

fragmenteket eredményez (a homozigóta egyedeket nem lehet a heterozigótáktól elkülöníteni). Továbbá néhány esetben a bonyolult, sok hasonló fragmentből álló mintázat nehézzé teheti az eredmények kiértékelését. Ezen kívül a kapott mintázatok fragmentjeinek mennyisége nem összehasonlítható, kvantitatív vizsgálatokra nem alkalmasak, mert a véletlenszerűen felsokszorozott fragmentumok lehetnek kis ("single copy"), közepes vagy nagy kópiaszámban ismétlődő genomszekvenciák részei is (Williams és mtsai., 1990).

A RAPD módszer felhasználható (al)faj-, ivar- vagy egyed-specifikus markerek azonosítására és tenyésztett változatok elkülönítésére (Dines és mtsai., 1993; 1996; Bardakci és Skibinski, 1994), természetes populációk genetikai diverzitásának felmérésére (Apostol és mtsai., 1996), kórokozók azonosítására és jellemzésére (Joachim, 1996) egyaránt. Sikerrel alkalmazzák a genetikai diverzitás becslésére és populáció analízisre (Foo, 1995) olyan esetekben, ahol a mikroszatellitek nem állnak rendelkezésre. Felhasználták már tenyészpopulációk beltenyésztettségi fokának vizsgálatára emlősök (Kantanen és mtsai., 1995) és halak esetében is (Yoon és Kim, 2001; Bártfai és mtsai., 2003), valamint genetikai térképek készítésére több fajban (Williams, 1993a; Postlethwaith, 1994; McClean, 2002; Borowsky és Wilkens, 2002).

Eredményesen alkalmazták a RAPD analízist hibridizácóinál, illetve a genommanipuláció különböző formáinál, így androgenezisnél, interspecifikus androgenezisnél és gynogenezisnél a sikeresség ellenőrzésére (Streit, 1994; Corley-Smith 1996; Chen, 1995; Bercsényi, 1998; Isoda, 2000). Néhány esetben pedig sikeresen használták ivar-specifikus DNS markerek izolálására úgy növényekben (Nakao, 2002; Urasaki, 2002), mint állatokban (Bello, 1999; Hunt és Page, 1994; Lessells és Mateman, 1998).

2.3.2 Mikroszatellit markerek és felhasználásuk lehetőségei

A mikroszatellitek az eukarióta genomban a kódoló és a nem kódoló régióban egyaránt előforduló 1-6 bp hosszúságú ismétlődő motívumokból felépülő DNS szakaszok. Jelölésükre a mikroszatellit elnevezésből származó MS rövidítés mellett az STR (Short Tandem Repeat) és SSR (Simple Sequence Repeat) rövidítéseket is használják. Közös jellemzőjük, hogy nagyfokú polimorfizmust mutatnak, amely az ismétlődések számában tapasztalható eltérésekből származik. Az ismétlődések száma a duplázódástól a több tucatig terjedhet (2-40), míg a mikroszatellit szekvenciák teljes hossza általában 50 és 500 bp között változik (Varga, 2000).

Felfedezését az 1970-es évekre tehetjük, ennek ellenére fontosságukra csak tíz évvel később, hívták fel a figyelmet Hamada és mtsai. (1982). Az ő kutatócsoportja több száz $(TG)_n$ szekvencia kópiát talált, több tízezer, gerinceseken elvégzett vizsgálat során. Később többen is megerősítették, hogy a mikroszatellitek jelen vannak az eukarióta genomokban és a viszonylag gyakori spontán mutációk miatt (mutációs rátájuk: $5x10^{-4}$-10^{-5}), nagyfokú polimorfizmust mutatnak, ugyanakkor a polimorfizmusok elég stabilak ahhoz, hogy nyomonkövethetők legyenek az analízisek során (Kashi és mtsai., 1997; Tautz és Renz, 1984; Hearne és mtsai., 1992).

A mikroszatellitek többé-kevésbé egyenletesen oszlanak el a genomban, becslések szerint minden 10 kb-ra jut egy ismétlődő szekvencia, így az eukarióta genomokban megközelítőleg 10^4-10^5 mikroszatellit található amely fajtól függően változhat (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Kimutatásuk az őket határoló egyedi szekvenciák felhasználásával lehetséges. Ezek általában konzervatív szekvenciák, amelyekre specifikus primerek tervezhetők és így a közrezárt ismétlődő szekvenciák PCR analízissel kimutathatók. A felsokszorozott mintázat egyszerű és gyorsan áttekinthető, mivel csak egy ponton vizsgálja genomot. A fragmentek kodomináns öröklődésmenetet mutatnak (a homozigóta egyedek elkülöníthetők a heterozigótáktól). Hasonlóan a legtöbb PCR alapú technikához a kimutatások mintaigénye kicsi és az eredmények jól reprodukálhatók (Kashi és mtsai., 1997).

E technika legnagyobb hátránya, hogy az új markerek kifejlesztése rendkívül költséges és munkaigényes feladat, mivel szükséges azon DNS szekvenciák pontos ismerete, amelyek alapján az új mikroszatellitek felsokszorozására alkalmazható primereket megtervezhetjük. Sok esetben így csak arra van lehetőség, hogy azokat a genomokat vizsgáljuk, amelyekből már izoláltak ilyen specifikus szekvenciákat. Jóllehet korlátozott mértékben van lehetőség arra, hogy a közeli rokon fajokra adaptáljunk mikroszatelliteket, azonban ennek sikeressége nagymértékben függ a fajok közötti evolúciós távolság mértékétől (Baratti és mtsai., 2001; Shepherd és mtsai., 2002; Hille és mtsai., 2002).

A mikroszatellitek felhasználási lehetőségei nagyon széleskörűek, így halak esetében is hatékony eszközei a genetikai térképek készítésének (Waldbieser és mtsai., 2001; McConnell és mtsai., 2000), de felhasználhatók származásellenőrzési vizsgálatokban (Bekkevold és mtsai., 2002), populációk genetikai vizsgálatára (Bartfai és mtsai., 2003; King és mtsai.,

2001) vagy fajták és vonalak megkülönböztetésére is (Bártfai és mtsai, 2003; Allen, 1995). Az állattenyésztési gyakorlatban a nemesítők munkáját is elősegítheti a MAS (Marker Assisted Selection) használatán keresztül. Bár a mikroszatellit vizsgálatok alapján végzett szelekció költségesebb, mint a hagyományos módszerek (Fésüs és mtsai., 2000), azonban jelentősen növelhető velük a szelekció hatékonysága.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 FELHASZNÁLT ANYAGOK

A kísérletekben felhasznált vegyszerek a SERVA és a REANAL cég termékei voltak, míg a restrikciós endonukleázokat és az egyéb DNS modifikációs enzimeket a Promega, az Amersham, a Minotech, vagy a Fermentas cégektől vásároltuk.

A gyakran használt molekuláris biológiai eljárásokat (restrikciós hasítás, kompetens sejt készítés, transzformálás, baktériumkultúrák szaporítása) Sambrook és munkatársainak (1989) receptjei szerint végeztem.

A kísérletekben szereplő pufferek és oldatok összetétele az M1. mellékletben szerepel.

3.2 KÍSÉRLETI ÁLLATOK

Kísérleteimet a harcsafélék egyik legnagyobb családjába, a *Clariidae* családba tartozó fajokon kezdtem meg, később a harcsafélék öt családjának, összesen tizenkét fajára és a pontyfélékhez tartozó compóra (*Tinca tinca*) terjesztettem ki.

A *Clariidae* családba tartozó több mint 100 faj Afrikában és Dél-Ázsiában őshonos (Burgess, 1989), de szívósságuk és nagy környezeti toleranciájuk miatt számos más területre is betelepítették őket, például Európába, Floridába vagy Hawaii-ra. A család legfontosabb és leginkább elterjedt képviselőjét az afrikai harcsát (*Clarias gariepinus*; Burchell, 1822) Afrikában, Ázsiában, Európában**,** ezen belül hazánkban is, tenyésztik (Huisman és Richter, 1987).

A *Clariidae* családba tartozó fajok jelentősége kiváló húsuk és intenzív tartásra való alkalmassága miatt egyre nagyobb. Tenyésztésükkel elsősorban olyan területeken foglalkoznak, ahol egész évben biztosítható a tenyésztéshez szükséges 23-25 °C-os meleg víz. Az intenzív tartás szempontjából fontos tulajdonságuk, hogy oxigén szükségletük egy részét a légköri oxigénből veszik fel, kisegítő légzőszervükkel, az ún. korall szervvel. Emellett táplálék spektrumuk is igen széles (Teugels, 1984; 1996). Nemcsak

az élő eleséget, hanem az állati eredetű melléktermékeket és a mesterségesen összeállított tápokat is szívesen fogyasztják.

A kísérleteimben felhasznált afrikai harcsa tenyészegyedeket az újszentmargita-tukai Intenzív Haltenyésztő Kft-től, és a szarvasi Szarvas Fish Kft-től szereztük be. A *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes, 1840) farokúszó minták ugyancsak a Szarvas Fish Kft-től származtak. A *Clarias macrocephalus* (Günther, 1864) DNS mintákat Dr. Graham Mair-től (Pathumthani, Thailand) kaptam, míg a *Clarias fuscus* (Lacepède, 1803) mintákat Prof. Arlo Fast gyűjtötte számomra Hawaii-ban (USA). A *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758), *Hoplosternum thoracatum* (Valenciennes, 1840), *H. litorale* (Hancock, 1828) és a *Corydoras aeneus* (Gill, 1858) egyedekkel Pasaréti Gyula (Akvárium Magazin, Budapest) járult hozzá a kísérletekhez.

A *Silurus glanis* (Linnaeus, 1758), *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1794), *Ictaulurus punctatus* (Rafinesque, 1818) és *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) farokúszó minták különböző magyarországi tenyészetekből származnak. A vörösúszós harcsa (redtail catfish; *Phractocephalus hemiliopterus*; Bloch és Schneider, 1801) mintákat a szingapuri Rainbow Fish Farm bocsátotta rendelkezésemre (1. táblázat).

3.3 TARTÁSI ÉS NEVELÉSI KÖRÜLMÉNYEK, SZAPORÍTÁS

A kísérleti halállomány tartása egy 100 m^2 alapterületű állatszobában történt, ahol a szoba hőmérséklete, illetve az akváriumfűtők szabályozása, állandó 28°C-os vízhőmérsékletet tartott fenn, valamint fényprogram biztosította a 16 órás nappali megvilágítást és a 8 órás éjszakai időszakot. Valamennyi víztartályban központi sűrített levegős rendszer biztosította a megfelelő oxigénellátást.

A tenyészállatokat ivaronként elkülönítve 600 literes kádakban tartottam hetenkénti teljes vízcserével. Az afrikai harcsák szaporítása a Horváth és mtsai. (1984) által kidolgozott eljárással történt: Az ovuláció, illetve a spermiáció kiváltása szárított ponty hipofízis (4-5 mg/kg testtömeg) 0.65 %-os NaCl oldatban készített szuszpenziójának hasüregbe injektálásával történt, mind az ikrás, mind a tejes egyedeknél, az ovuláció tervezett időpontja előtt 8-10 órával.

Az ovulált anyák fejésével kinyert ikrákat *in vitro* fertilizációval termékenyítettem meg, az apaállatok műtéti úton kinyert heréjének szuszpenziójával. Az ivartermékeket először (gondosan ügyelve, hogy vízzel ne érintkezzenek) összekevertem, majd 1cm^3 ikrához kb. ugyanannyi állott csapvizet adva indukáltam a spermiumokat. Egy perc várakozás után lassan, több lépésben adagoltam a vizet, így biztosítva az ikra optimális duzzadását. A kellően megduzzatt és megkeményedett héjú ikrákat ezután a recirkulációs rendszerbe helyeztem.

A lárvák és növendék egyedek nevelése 5 literes műanyag medencékből összeállított recirkulációs rendszerben történt 28°C-on. Etetésükre az első hetekben sórákot (Sanders Brand Premium Grade Artemia Cysts, Sanders Brine Shrimp Co.) és Tetra Baby Fish Food L kishaltápot (Tetra, Blacksburg), később TetraMin C (Tetra, Blacksburg) lemezes tápot és kis, illetve nagy szemcsés, granulált Harcsa és Pisztráng ivadéktápot használtam (Haltáp Kft, Szarvas). Az egyedileg, illetve kis csoportban elhelyezett halak tartását és nevelését kezdetben 10-35 l-es, később 100-160 l-es üvegakváriumokban oldottam meg hetenként kétszeri vízcserével. A növekedéssel párhuzamosan csökkentettem a medencében az egyedszámot, vagy növeltem a medence méretét.

3.4 MINTAVÉTEL, DNS IZOLÁLÁS

A RAPD analízisekhez ivarérett egyedekből boncolást és az ivarszervek vizuális ellenőrzését követően gyűjtött szövetmintákat (farokúszó) használtam. A begyűjtött szövetminták, annak méretétől függően 200-600µl SET pufferben fagyasztva, vagy fagyasztás nélkül jégen, néhány esetben 96%-os etanolban, környezeti hőmérsékleten szállítva jutottak el a laboratóriumba, ahol felhasználásig -20 ºC-on tároltam őket.

Az úszómintákat SET pufferben 0,5 µg/ml Proteinase K enzim (Sigma P-6556) hozzáadásával egy éjszakán keresztül 55 ºC-on rázatva emésztettem. A DNS-t fenol-kloroformos tisztítási eljárással izoláltam (Sambrook és mtsai., 1989), majd 1/10 térfogat Na-acetátot (pH 7,2), és 2,5 térfogat -20 °C-os, 96%-os etanolt adtam hozzá. Ezt követően -70 °C-on 30 percig vagy -20 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltam, majd 15 percig centrifugáltam (15000 rpm). A csapadékot 1 ml 70 %-os etanollal kétszer átmostam, szobahőmérsékleten kiszárítottam, majd 100 µl 1xTE pufferben oldottam fel, és 10 µl ribonukleáz-A oldat hozzáadása után 30 percig 37 °C-on inkubáltam. Az oldat DNS tartalmát (koncentrációját), 0,8-1,2 %-os

(a detektáláshoz ethidium-bromidos festést alkalmaztam) agaróz (Sigma, Gibco) gélelektroforézist követően, ismert koncentrációjú minta alapján végzett becsléssel, vagy fotometriás méréssel (OD260) határoztam meg. A mintákat 4 ºC-on tároltam a további felhasználásig. Az egyes fajokból rendelkezésemre álló minták számát az 1. táblázat mutatja.

3.5 MINTAGYŰJTÉS ÉS MINTAELŐKÉSZÍTÉS LÁRVÁK IVARMEGHATÁROZÁSÁHOZ

A lárvák ivarának molekuláris meghatározásához 1-2 cm-es egyedekből végeztem a mintavételt a megtermékenyítést követő 3-5. héten a farokúszó levágásával, az egyedek elpusztítása nélkül. A szövetmintákat a további feldolgozáshoz 100 µl SET pufferbe helyeztem. Tekintettel a begyűjtött minták rendkívül kis térfogatára a minták feldolgozását minden esetben, a mintavételt követően azonnal megkezdtem. Az egyedeket az ivarmeghatározás ideje alatt egyedileg 50 ml-es Falcon csövekbe helyeztem el, naponkénti vízcserével és folyamatos táplálékellátással (sórák).

Az ivarmeghatározáshoz a szövetmintákat a korábbi mintafeldolgozásokhoz hasonlóan egy éjszakán keresztül rázatva emésztettem SET pufferben 0,5 µ/ml Proteinase K felhasználásával, 55 ºC-on. Ezt követően azonban a minták további tisztítása nélkül, 250 µl -20 °C-os, 96%-os etanolt adtam az oldathoz, majd 15 percig centrifugáltam 15000 rpm-en. A csapadékot szobahőmérsékleten kiszárítottam és 100 µl steril desztillált vízben oldottam fel. Az így előkészített mintákat 4 ºC-on tároltam a további felhasználásig.

Az ivarmeghatározást követő felneveléshez az egyedeket ivaronként csoportosítottam és a korábban ismertetett módon neveltem fel.

3.6 RAPD ANALÍZIS

Az azonos ivarhoz tartozó egyedek mintáinak csoportosításával hím- és nőivarú „DNS-poolokat” hoztunk létre úgy, hogy mind az egyedek száma, mind a minták koncentrációja azonos legyen. Az így kapott pool-okat használtuk fel később az összehasonlító RAPD analízis során az ivarok közötti különbségek keresésére. A csoportosított mintákkal kapott ún. „feltételes pozitív” eredményeket egyedi mintákon végzett RAPD vizsgálatokkal erősítettem meg.

1. táblázat: A kísérletekben szereplő fajok egyedszáma, taxonómiai besorolása és beszerzésének forrása

Név	Egyedszám	Család	Származási hely
Clarias batrachus	6db	*Clariidae*	Akvarisztikai kereskedelem
Clarias fuscus	16db	*Clariidae*	Hawaii, (USA)
Clarias gariepinus	> 100 db	*Clariidae*	Szarvas Fish Kft v. újszentmargita-tukai Intenzív Haltenyésztő Kft
Clarias macrochephalus	6db	*Clariidae*	Pathumthani, (Thailand)
Heterobranchus longifilis	20db	*Clariidae*	Szarvas Fish Kft
Heteropneustes fossilis	10db	*Heteropneustidae*	magyarországi tenyészetek
Corydoras aeneus	6db	*Callichthyidae*	Akvarisztikai kereskedelem
Hoplosternum litorale	4db	*Callichthyidae*	Akvarisztikai kereskedelem
Hoplosternum thoracatum	4db	*Callichthyidae*	Akvarisztikai kereskedelem
Phractocephalus hemiliopterus	6db	*Pimelodidae*	Rainbow Fish Farm (Szingapúr)
Ictalurus punctatus	8db	*Ictaluridae*	hazai tenyészetekből
Silurus glanis	7db	*Siluridae*	magyarországi tenyészetek
Tinca tinca	100db	*Cyprinidae*	magyarországi tenyészetek

A RAPD reakciókat Bercsényi és mtsai. (1998) által leírt eljárás alapján végeztem, 25 µl végső térfogatban. A kísérletekben használt 10 bázishosszúságú (ún. 10mer) oligonukleotid primereket az Operon Technology (Alameda, CA, USA) és a UBC (University of British Columbia, Vancouver, Canada) nevű cégektől származtak (lásd: M2. melléklet). A primerek pontos szekvenciája a következő internetes oldalakon érhetők el:

UBC: www.biotech.ubc.ca/services/naps/primers.html
Operon Technology: www.westburg.nl/download/rapdweb.xls

A kísérletek során három különböző PCR készüléket használtam: a Perkin Elmer cég PCR1-es és GeneAmp PCR System 9700-as készülékeit, valamint az MJ Research TPC-100 készülékét. Az utóbbi két készülék hőmérsékletváltoztatásának sebességét az első készülékhez igazítottam (körülbelül 1°C/másodperc), hogy az eredmények összehasonlíthatóak legyenek.

A RAPD reakciókat követően a mintákhoz 1/5 térfogatnyi TBE-stop puffert adtam. A reakciók eredményeket 0.5 µl/ml ethidium-bromidot, vagy 100,000x hígított Gelstar-t (FMC BioProducts) tartalmazó, TBE pufferrel készült 2%-os agaróz (Gibco) gélen választottam el. A RAPD mintázatokat UV lámpán (ethidium bromid), vagy DarkReader-en (Cleare Chemichal Research; a Gelstar esetében) lefényképeztem, és vizuálisan analizáltam. A fragmentek méretének meghatározásához molekulasúly markerként a lambda fág *Pst*I enzimmel emésztett genomját, vagy előre gyártott 100bp-os fragment létrát (Roche) használtam.

3.7 FRAGMENTEK KLÓNOZÁSA, SZEKVENÁLÁSA ÉS AZ ADATOK ANALÍZISE

A RAPD mintázatokból kiválasztott ivarspecifikus (CgaY1; CgaY2) és kontroll (CgaK1) fragmenteket, az elektroforézist követően a gélből kivágtam, majd Sambrook és munkatársainak (1989) módszerével vagy QIAquick Gel Extraction Kit-tel (Qiagen) nyertem vissza a gélből. A DNS fragmentumok mennyiségének meghatározása 2%-os agaróz (Gibco) gélen ismert mennyiségű λ fág DNS-hez hasonlítva, becsléssel történt. A fragmentek klónozását Topo TA Cloning kittel (Invitrogen), pCR2.1-TOPO

vektorába (lásd: M3. melléklet) ligálva és Topo 10F' *E.coli* kompetens (Invitrogen) sejtbe transzformálva végeztem.

Ezt követően 100 μg/ml ampicillint tartalmazó LB agar lemezekre szélesztettem, majd egy éjszakás 37 ºC-os inkubálást követően 20-20 fehér kolóniából, Sambrook és munkatársainak (1989) receptje szerint, vagy Plasmid Mini Kit-el (Qiagen) plazmidot izoláltam, amelyeket restrikciós emésztéssel és/vagy PCR amplifikációval ellenőriztem.

Az mindegyik fragment esetében 3-3 klón szekvenálása történt meg, M13 forward és M13 reverse szekvenáló primerekről kiindulva, mindkét irányból, BigDye Terminator v2.0 Cycle Sequening Kit (Applied Biosystems) és ABI Prism 377-es (Applied Biosystems) szekvenáló berendezés felhasználásával, a gyártó ajánlásai szerint. A szekvencia adatok további feldolgozása, és összehasonlítása Sequencher software-rel (Gene Codes Corp.) történt.

3.8 SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓ

Minden esetben három mikrogrammnyi genomi DNS-t emésztettem 10 U restrikciós endonukleázzal, 30 μl végső térfogatban, az enzim gyártója által mellékelt puffer felhasználásával, egy éjszakán keresztül 37 ºC-on. Másnap reggel további 5 U enzimet adtam a reakcióhoz és még három órán keresztül inkubáltam. A CgaY1 fragmentel végzett hibridizáció esetében Bgl II, Bspx I, BstE II, EcoR I, EcoR V, Hind III, Not I, Pac I és Sca I, míg a CgaY2 hibridizációknál Alu I, Bgl II, Bst UI, Dra I, Hae III, Hha I, Msp I, Rsa I és Sau 3A enzimeket használtam.

Az emésztett DNS méret szerinti elválasztását 0,5 μg/ml etidium bromidot tartalmazó 0,8%-os agaróz gélen végeztem 1xTBE pufferben, 4°C-os hőmérsékleten 16 órán keresztül, 30 V feszültségen. Ezt követően a gélt UV lámpán lefényképeztem, majd gélben történő denaturálást és renaturálást követően (Sambrook és mtsai., 1989) a DNS-t kapilláris blottal Nytran-N-nylon membránra (Schleicher & Schuell) vittem át 20x SSC pufferrel. A blottolást egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten végeztem. A blot szétszedése után a membránt megszikkasztottam, majd a DNS-t UV fénnyel (120 nJ/cm^2 Ultraviolet Crosslinker/Amersham) és/vagy 2 órás 80 C^o-os inkubációval a membránhoz kötöttem.

A hibridizációkhoz minden esetben DIG-el jelölt hibridizációs próbát használtam, amelyet specifikus PCR-rel állítottam elő. A PCR reakcióban plazmid DNS templátot, belső specifikus primereket és DIG-dNTP mixet használtam, a specifikus PCR reakcióknál leírtakkal azonos körülmények

között 20 µl végső térfogatban, vagy M13 és T7 szekvenáló primereket alkalmaztam Probe Synthesis Kit-tel (Roche) a gyártó előírásai szerint. A próba előállítás és a jelölés sikerességének ellenőrzéséhez, a RAPD reakcióknál leírtakkal azonos módon, a jelölő reakcióból 2 µl-t, 1,5%-os agaróz gélen elválasztottam és kontroll PCR reakcióhoz hasonlítottam.

A jelölt próbával végzett Southern hibridizációt a Roche cég előírásai szerint végeztem. A felkötött DNS-t hordozó membránt 42 °C-on 3 órán át 10-15 ml High-SDS-Hyb pufferben prehibridizáltattam. A hibridizációt 3-5 ml térfogatú 2 µl (200-500ng) próbát tartalmazó friss High-SDS-Hyb pufferben végeztem szintén 42 ºC-on, minimum 16 órán keresztül.

A membránokhoz nem (specifikusan) kötődött próba eltávolításához a membránokat kétszer mostam öt percen keresztül szobahőmérsékleten 2x mosó oldatban, majd kétszer 5 percig, 68 C-on, 0.5x mosó oldatban. Ezt követően a hibridizált próbát kemolumineszcens kimutatással detektáltam Anti-DIG-AP és CSPD vagy CDP-Star szubsztrát (Roche) felhasználásával a gyártó előírásainak megfelelően.

3.9 "ZOO HIBRIDIZÁCÓ"

Tizenkét harcsafaj genomiális DNS-ét teszteltem „zoo hibridizációval" (Cutter és mtsai., 1992) az ivarspecifikus markerekből készített próbákkal. A hibridizáció előkészítése, a hibridizációs próbák elkészítése és a hibridizáció a South ern hibridizációnál leírtakkal azonos módon zajlott. A hibridizációt követő membrán mosásokat azonban engedékenyebb körülmények között végeztem. Szigorúbb körülmények között a membránok harmadik és negyedik mosása 68 ^{o}C-on történt a Southern hibridizációk során, míg a „zoo hibridizáció" esetében ezek kevésbé szigorúan 65 ^{o}C-on zajlottak.

3.10 RÉSZLEGES GENOMI KÖNYVTÁR KÉSZÍTÉSE ÉS VIZSGÁLATA

A CgaY1 marker feltételezett homológ fragmentjének izolálásához a *Clarias batrachus* faj négy hímivarú egyedének genomiális DNS-ét *Bam*HI restrikciós endonukleázzal emésztettem, majd 0,8%-os agaróz gélen TBE pufferben elválasztottam a fragmenteket. Ezt követően a „zoo hibridizáció" során azonosított, a CgaY1 próbával hibridizáló fragmentnek megfelelő

mérettartományt (~4500 bp) a gélből kivágtam. A DNS-t GFX™ PCR DNA és Gel Band Purification Kit-tel (Amersham) tisztítottam.

Az izolált fragmenteket T4 DNS ligázzal (Stratagene), a gyártó ajánlásának megfelelően *Bam*HI enzimmel felnyitott és SAP enzimmel (Roche) defoszforilált végű Bluescript KS+ plazmidba (Strategene) ligáltam (lásd: M4. melléklet). Az így kialakított részleges genomikus könyvtárat XL10-Gold® Ultracompetent *E.coli* sejtekbe transzformáltam, a gyártó előírásai szerint, majd ampicillint (150µg/ml), IPTG-t (20µg/ml) és X-gal-t (40µg/ml) tartalmazó LA táptalajra szélesztettem a sejteket. A felnövekvő kolóniák többsége (kb.: 98%-a) inszertet hordozott, azaz fehér színű volt a kék/fehér szelekció során.

A baktérium telepek analízisét kolónia hibridizációval végeztem a Roche cég előírásainak megfelelően. A hibridizációs próbát a Southern hibridizációnál leírtakkal azonos módon készítettem és kemoluminescens technikával detektáltam, Anti-DIG-AP és CDP-Star szubsztrát (Roche) felhasználásával.

Az erős hibridizációt mutató kolóniákat átoltással összegyűjtöttem. A bennük található inszert DNS hosszát kolónia-PCR-rel ellenőriztem. A reakció összetétele a következő volt: 1x Promega PCR puffer, 200-200 µM minden dNTP alkotóból, 300-300 nM M13 forward és M13 reverse primer, 2 mM $MgCl_2$, 1U Taq DNS polimeráz (Promega), 25 µl végső térfogatban. A ciklus körülmények: 95 °C 2 perc, 56 °C 1 perc és 2 perc 72 °C-on majd 35 ciklusban ismétlődve 30 másodperc 95°C-on, 30 másodperc 56 °C-on és 1 perc 72°C-on. Ezt követően 5 percig 72 °C-on végső szál szintézis.

Ezután a kolónia PCR-rel nyert terméket szekvenáláshoz készítettem elő. Ennek során 5 µl (~1µg DNS) kolónia-PCR termékhez 0,1 µl 10x SAP puffert, 0.5 U „shrimp alkalikus foszfatáz” enzimet, és 5U *Exo*I enzimet adtam, majd steril desztillált vízzel 7 µl-re egészítettem ki. Ezt követően 30 percig 37 °C-on, majd 15 percig 80 °C-on inkubáltam. Az előkészített fragmenteket M13 forward és M13 reverse szekvenáló primerekről kiindulva az ivarspecifikus fragmentek szekvenálásánál leírtakkal azonos módon mindkét irányból szekvenáltam. A szekvenáló reakciók eredményének leolvasása ez esetben is ABI Prism 377-es készüléken történt.

A leolvasott DNS szekvenciák vektorból származó végeinek eltávolítására és páronkénti összeillesztésére a Sequencher software-t (Gene Codes Corp.) használtam. Ezt követően ugyanezzel a programmal végeztem

az egyes klónok szekvenciáinak összehasonlítását egymással és a próbaként használt CgaY1 szekvenciával. Az összehasonlítások alapján kiválasztottam 38 klónt, amelyekhez szekvenciáik alapján az 5.11 fejezetben ismertetett módon specifikus primer párokat terveztem. A PCR reakciók optimalizálására az MJ Research TPC-100 készülékét használtam. Ennek során az annealing hőmérsékletet 50 és 70 °C között, a Mg^{2+} koncentrációt 1-5 mM változtattam. Az optimalizált reakciókkal a RAPD analízisnél ismertetett módon kialakított csoportosított DNS mintákon teszteltem az egyes szekvenciák ivarspecifikus voltát.

A könyvtárból származó DNS szekvenciákban, Tandem Repeats Finder 2.02 software-rel (Benson, 1999) kerestem ismétlődő, mikroszatellit típusú szekvenciákat és felhasználtam őket hasonló szekvenciák keresésére a GenBank, BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) és a TIGR adatbázisban (www.tigr.org/tdb/tgi/) is.

3.11 MULTIPLEX PCR REAKCIÓK

Mind az ivarspecifikus, mind pedig a kontroll fragmentek felamplifikálására specifikus primer párokat terveztem a konszenzus szekvenciák alapján Primer Premier 4 (Premier Software International) software-rel, vagy az interneten elérhető Online Primer3 programmal (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). A PCR reakciók optimalizálására felhasznált egyedi PCR reakciók összetétele minden fragment esetében azonos volt: 1x Promega PCR puffer, 200-200 µM minden dNTP-ből, 500 nM minden primer-ből, 1-5 mM MgCl2, 0.75 U Taq polimeráz (Promega, Madison, WI, USA) és 20 ng templát DNS, 25 µl végső térfogatban. Az optimalizálás során az annealing hőmérséklet (50 és 70 °C között) és a Mg^{2+} koncentráció (1-5 mM) beállítása az Eppendorf cég Mastercycler gradient PCR készülékén történt. A PCR ciklus körülményei a következők voltak: amplifikációt megelőző denaturáció 94 °C 2 perc, ezt követte 30 ciklusban ismétlődve 94 °C 20 másodperc, annealing hőmérséklet 20 másodperc és 72 °C 1,5 perc. Ezt követően 72 °C 5 perc végső szál szintézis. A reakciók eredményének detektálása a RAPD reakcióknál leírtakkal azonos módon történt.

A multiplex reakciók beállításához több primer pár optimalizált PCR reakcióinak adatai alapján kiválasztottunk a két ivar-specifikus és az egy kontroll fragment felsokszorozást azonos körülmények között lehetővé tevő primer párokat és körülményeket, majd a 2-2 primer párt (pl.: CgaY1 és

CgaK1, CgaY2 és CgaK1) egy reakcióban felhasználva duplex reakciókat alakítottunk ki. Ennek során optimalizáltuk a PCR puffer koncentrációját (0,8x-1x), az annealing hőmérsékletet (55 és 65°C között), a lánchosszabbítás idejét (20-90 másodperc) és a primer párok koncentrációját (20-600 nm).

Ezen duplex reakciók közül egyet a későbbiekben felhasználtunk lárvák fenotípusos ivarának előrejelzésére. A reakció összetétele a következő volt: 0.9x Promega PCR puffer, 200-200 μM minden dNTP alkotóból, 500-500 nM Y1-5F és -1R primer, 30-30 nM K1-1F és -1R primer, 2 mM $MgCl_2$, 1U Taq DNS polimeráz (Promega), valamint 20 ng genomi templát DNS, 25μl végső térfogatban. Az optimális ciklus körülmények ennél a duplex reakciónál a következőek voltak: amplifikációt megelőző denaturáció 94 °C 2 perc, majd 30 ciklusban ismétlődve 20 másodperc 94 °C-on, 1 perc 62,5°C-on és 3 perc 72 °C-on. Ezt 72 °C-on 5 perces végső szál szintézis követte.

A duplex reakciók eredményeit újra összehasonlítottuk és kettő összevonásával három primer párt egy triplex PCR reakcióba tesztelve újra optimalizáltuk a reakciót, a duplex reakcióknál leírtakkal azonos módon addig, míg mindhárom fragment közel azonos intenzitással sokszorozódott fel.

A tesztelt primerekből a következőket választottuk ki és használtuk a későbbiekben:

Y1-2F: 5'-CTGTTCATTGAAGCGACTTCTG-3';
Y1-1R: 5'-GAACTGAACCCCACATTTTGTC-3';
Y1-5F: 5'-CTGGCTTTTATAGTTAAGGGAC-3'
Y2-1F: 5'-TGACCCTAGACCAGGACGTAAC-3';
Y2-1R: 5'-AACTCAGATCACACTGAATGCG-3';
K1-1F: 5'-AGTACATTGAGGACGAGGACGC-3';
K1-1R: 5'-CATTGTAACAAGAGGAGCCCAC-3'.

A triplex reakcióelegy összetétele a következő volt: 0.8x Promega PCR puffer, 200-200 μM minden dNTP alkotóból, 500-500 nM Y1-F2 és -R1 primer, 60-60 nM Y2-F1 és -R1 primer, 30-30 nM K1-F1 és -R1 primer, 2 mM $MgCl_2$, 1U Taq DNS polimeráz (Promega) valamint 20 ng genomi templát DNS, 25μl végső térfogatban. A optimális ciklus körülmények a triplex reakció esetén: amplifikációt megelőző denaturáció 94 °C 2 perc, majd 30 ciklusban ismétlődve 20 másodperc 94 °C-on, 20 másodperc

61 °C-on és 1 perc 72 °C-on. Ezt 72 °C-on 5 perc végső szál szintézis követte.

3.12 AZ IVARSPECIFIKUS MARKEREK TESZTELÉSE LÁRVÁK MOLEKULÁRIS SZEXÁLÁSÁVAL

A korábbi tesztektől különálló kísérletben vizsgáltam a CgaY1 szekvencia alkalmasságát populációk egyedeinek ivarmeghatározására. Ennek során egy tejes és egy ikrás egyed keresztezéséből származó utód generációt vizsgáltam. A szaporítás, a mintavétel és a mintafeldolgozás a korábban leírtakkal azonos módon történt.

A kísérletben az ivar meghatározására duplex PCR reakciót használtam, amely a hím ivarú egyedekből kettő fragmentet (CgaY1 és kontroll), a nőivarú egyedekből pedig csak egyetlen kontroll fragmentet sokszorozott fel. A PCR reakció összetétele és reakció körülményei megegyeztek a duplex reakciónál leírtakkal. Az annealing hőmérséklet 62,5 °C, a Mg^{2+} koncentráció 2 mM volt. A reakcióban az Y1-5F, az Y1-1R, a K1-1F és a K1-1R primereket használtam. A tesztet követően az egyedeket az eredmények alapján ivaronként csoportosítva neveltem öt hónapos korig.

A fenotípusos ivar megállapítását a növendékek szövettani vizsgálatával végeztem, Guerrero és Selton (1974) módszere alapján. Ennek során az öt hónapos egyedekből boncolás során eltávolítottam a már differenciálódott, de még éretlen és vizuálisan nem elkülöníthető fejletlen ivarszerveket. A frissen preparált mintákat tárgylemezre helyezve 3-5 percen keresztül acetocarmin festékkel festettem meg, majd egy fedőlemezzel lepréselve elvékonyított kenetet készítettünk. Ezt követően a kiértékelés mikroszkóp alatt 40-100x-os nagyításon történt.

4. EREDMÉNYEK

4.1 IVARSPECIFIKUS DNS MARKEREK KERESÉSE HARCSA- ÉS PONTYFÉLÉK GENOMJÁBAN

Először az afrikai harcsán végeztünk összehasonlító RAPD vizsgálatokat ivar szerint csoportosított DNS mintákkal, a későbbiekben pedig további négy, a *Clariidae* családba tartozó harcsafajból és a compóból (*Tinca tinca*) kíséreltem meg ivarspecifikus markerek azonosítását hasonló eljárással.

A vizsgálatok két lépcsőben történtek. Először több (lehetőség szerint legalább 10 db) azonos ivarú egyed DNS-éből képzett csoportosított minta („pool") vizsgálata során kiválasztásra kerültek azok a primerek, amelyek a két ivarból kapott mintázatokat összehasonlítva polimorfizmust mutattak, azaz legalább egy csíkban eltérő mintázatot produkáltak. Az ikrás és tejes egyedek „pool-ozott" genomján valamennyi harcsafajnál megközelítőleg 300 primer tesztelése történt meg, míg a compó esetében 100 RAPD primerrel végeztem el összehasonlító analízist.

A primerek többsége az egyes fajok mindkét ivarában azonos mintázatot amplifikált (1/A. ábra), de minden esetben megtalálhatóak voltak olyan primerek is, amelyeknél a felsokszorozott mintázat eltérő volt a két ivarban. A *Clarias gariepinus* faj esetében 30, *Clarias batrachus*-nál 48, a *Clarias macrocephalus*-nál 56, *Clarias fuscus*-nál 76, *Heterobonchus longifilis*-nél 50 és a compó esetében 6 primer esetén mutatkoztak úgynevezett „feltételezett markerek" (2. táblázat), melyek eltérő mintázatot eredményeztek a két ivarban.

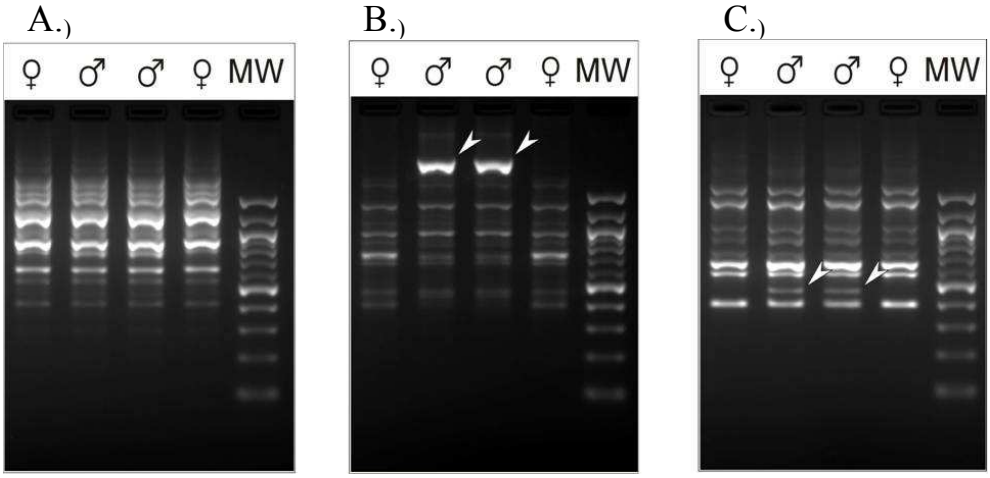
A második lépcsőben ezeket a primereket - a csoportosított mintákban is szereplő - egyedi DNS mintákon vizsgáltuk, így tesztelve a feltételezett markereket. Ezen vizsgálatok során két primer által produkált mintázat mutatott szoros kapcsoltságot a boncolással detektált fenotípusos ivarral, mégpedig mindkettő a *Clarias gariepinus* faj hím egyedeiben. A másik öt faj genomjából nem sikerült ivarspecifikus markert izolálni.

2.táblázat: Ivarspecifikus markerek keresése harcsafélék és compó genomjában összehasonlító RAPD analízissel

Faj	DNS minta/pool	Analizált primerek	Feltételezett marker	Igazolt marker
Clarias gariepinus	10 tejes 10 ikrás	OPA 01-20 OPF1-20 OPM1-20 OPO1-20 OPQ1-20 OPA6 OPS11 OPY14 OPY16 OPE7 OPE12 UBC 101-200 UBC 701-800	30	2
Clarias batrachus	4 tejes 2 ikrás	OPAA 01-20 OPAB 01-20 OPAC 01-20 OPAD 01-16 OPAE 01-20 OPAF 01-20 OPAG 01-20 OPAG 01-20 OPAH 01-20 OPAJ 01-16 OPAO 01-10 OPBC 01-20 OPBD 01-20 OPBE 01-20 OPBF 01-20 OPBG 01-16	48	0
Clarias macrochephalus	3 tejes 3 ikrás		56	0
Clarias fuscus	2 tejes 2 ikrás		76	0
Heterobranchus longifilis	10 tejes 10 ikrás		50	0
Tinca tinca	50 tejes 50 ikrás	UBC 701-800	6	0

Az afrikai harcsa genomjából mindkét primer egy-egy hím-specifikus markert sokszorozott fel. Az első markert, egy megközelítőleg 2600 bp nagyságú fragmentet (CgaY1) az OPO-01-es RAPD primer amplifikálta (1/B.ábra), míg a közel 500 bp nagyságú másodikat (CgaY2) az OPM-08-as

(1/C. ábra; Kovács és mtsai., 2001). Az egyedeken végzett ellenőrzés során kapott eredmények további megerősítése céljából mind az újszentmargita-tukai Intenzív Haltenyésztő Kft (20 db), mind a Szarvas Fish Kft (20db) populációjából származó ismert ivarú egyedtől származó minták vizsgálatát végeztem el. A CgaY1 marker mind a negyven hím egyedben jelen volt, míg a negyven nőivarú egyed egyikéből sem volt kimutatható. A CgaY2-t a negyven tesztelt hím egyed közül kettő genomjából nem sikerült felsokszorozni, míg a 40 nőivarú egyed közül egynek a mintázatában sem volt jelen.

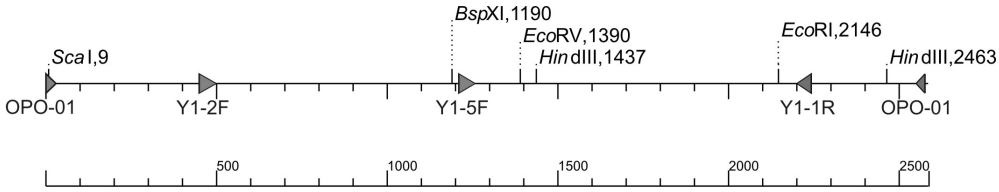


1.ábra: A „poolozott” tejes és ikrás minták összehasonlító RAPD analízise két hím-specifikus markert azonosított az afrikai harcsa genomjából: *A:* A legtöbb primerrel végzett vizsgálat ugyanazt a mintázatot mutatta mindkét ivar esetén (akárcsak a példaképpen bemutatott OPO-08-as); *B*: Az OPO-01-es primer mindkét tejes poolban egy számfeletti fragmentet (CgaY1; kb. 2.6 kb; nyilakkal jelölve) amplifikált, amely az ikrásoknál hiányzott; *C*: Az OPM-08-as primer esetében szintén feltűnt mindkét hím poolban egy fragment, a CgaY2 marker (kb. 500 bp; nyilakkal jelölve) amely a nőivarú poolokból hiányzott. Az MW jelölés mindhárom panel esetén 100 bp-os molekulasúly markert jelöl (New England Biolabs).

4.2 AZ IZOLÁLT MARKEREK SZEKVENCIÁINAK JELLEMZÉSE

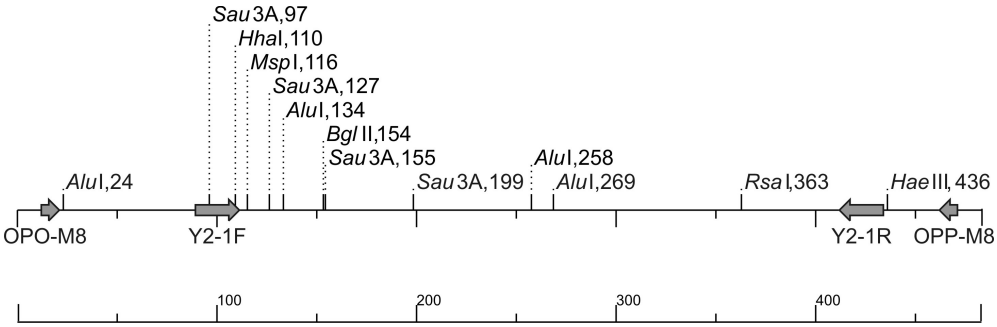
Az agaróz gélen elválasztott RAPD mintázatokból izoláltam és plazmid vektorba klónoztam az afrikai harcsában azonosított marker fragmenteket (CgaY1 és CgaY2). Ezt követően a fragmentek mindkét végéről, a plazmid szekvenáló primereiről kiindulva határoztam meg a bázissorrendjüket (lásd: M5. melléklet). Ennek eredményeként a rövidebb CgaY2 fragment esetében a teljes bázissorrendet sikerült közvetlenül meghatároznom, míg a hosszabb CgaY1 fragment esetében a hiányzó, középső DNS szekvencia meghatározásához két belső primerről kiinduló újabb szekvenálásra volt szükség.

A CgaY1 marker pontos hossza 2584 bp-nak, míg a CgaY2-é 458 bp-nak bizonyult. A restrikcios hasitohelyek pozicioit es a PCR soran hasznalt primerek feltapadasi helyeit a 2. (CgaY1) es 3. ábrak (CgaY2) mutatjak. Mindkét marker teljes DNS szekvenciáját elérhetővé tettük a GenBank-ban (hivatkozási számok: CgaY1 - AF332597; CgaY2 - AF332598).



2. ábra: A CgaY1 ivarspecifikus fragment sematikus ábrája. Az OPO-01 jelölések a RAPD analízis során használt 10 bp hosszúságú primer feltapadási helyeit mutatják, míg az Y1-2F, Y1-1R, illetve Y1-5F jelzések az azonos nevű, a specifikus multiplex PCR reakciók során használt primerek feltapadási helyét jelzik. A BspxI, Eco RI, Eco RV, Hind III és Sca I rövidítések a Southern hibridizáció során használt restrikciós enzimek hasítási helyét jelölik.

Mindkét ivarspecifikus szekvencia bázisösszetétele AT-gazdagnak mutatkozott: az AT/(AT+GC) arány 60,6% volt a CgaY1 illetve 60,2% a CgaY2 esetében. A DNS-szintű összehasonlító vizsgálatok során egyik fragment sem mutatott egyértelmű hasonlóságot a GenEMBL vagy a TIGR Zebrafish Index adatbázis szekvenciáival.



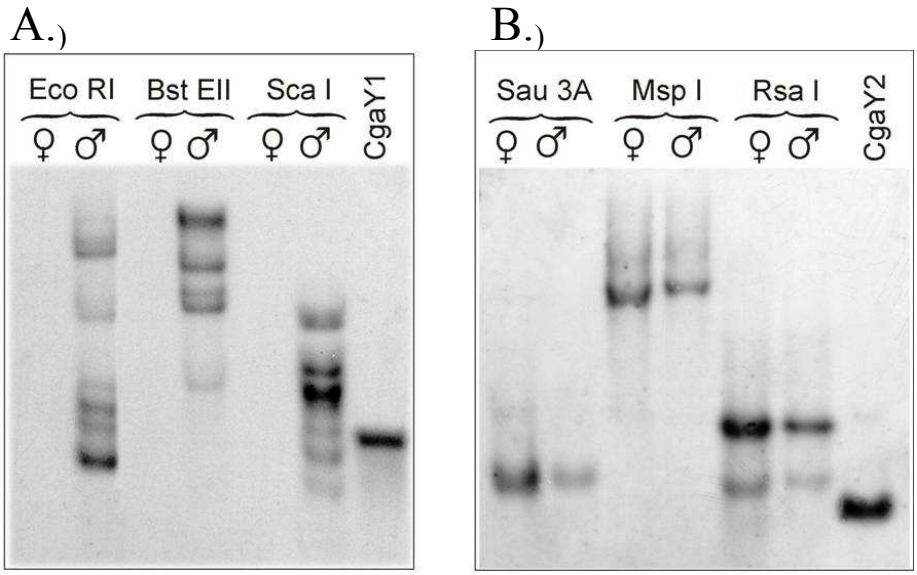
3. ábra: A CgaY2 ivarspecifikus fragment sematikus ábrája. Az OPM-08 jelölések a RAPD analízis során használt 10bp hosszúságú primer feltapadási helyeit, míg az Y2-1F, Y1-1R jelzések az azonos nevű, a specifikus multiplex PCR reakciók során használt primerek feltapadási helyét mutatják. A Bgl II, Hae III, Hha I, Msp I, Rsa I, Alu I és Sau 3A rövidítések a Southern hibridizáció során használt enzimek hasítási helyét jelzik.

A CgaY1 marker 3' vége (198 bp) fehérje szinten alacsony (48-54%) szekvencia homológiát mutatott tirozin foszfatáz (PTP vagy PTEN) génekkel. A marker 5' vége kilenc EST szekvenciával mutatott hasonlóságot (44-46%), köztük a zebradánióból származó *zFF1* transzkripciós faktorral (Lin és mtsai., 2000; Liu és mtsai., 2000),. A CgaY2 marker egy a *Takifugu rubripes*-ből származó reverz transzkriptáz enzimmel (Poulter és mtsai., 1999) mutatott fehérje szinten gyenge homológiát (39%) egy 254bp hosszúságú szakaszon.

A két ivarspecifikus marker mellett egy olyan fragmentet (CgaK1) is kiválasztottam az OPO-01-es primer által amplifikált RAPD mintázatból, amely mindkét ivar minden egyedében jelen volt. Emiatt alkalmasnak tűnt arra, hogy pozitív belső kontrollként szolgáljon szexálásra alkalmas multiplex PCR reakciók során. A fragmentet (697 bp) izoláltam, klónoztam és szekvenáltam (lásd: M5. melléklet). Szekvenciáját ugyancsak elérhetővé tettük a GenBank adatbázisában (hivatkozási szám CgaK1 - AF332599). Összehasonlítva a GenBank-ban található szekvenciákkal sem DNS, sem fehérje szinten nem mutatott hasonlóságot egyetlen esetben sem.

4.3 AZ IVARSPECIFIKUS MARKEREK VIZSGÁLATA SOUTHERN HIBRIDIZÁCIÓVAL

A markerek ivarspecifikusságának megerősítésére, valamint kópiaszámuk becslésére Southern hibridizációs analízist végeztem. Ennek során mindkét esetben kilenc-kilenc restrekciós enzimet használtam a genomi DNS emésztéséhez.



4.ábra: A két marker ivarspecifikusságának további tesztelése és kópiaszámának becslése *C. gariepinus* genomjában Southern hibridizációval. A CgaY1 próba csak a hímek genomjában adott jelet (A), míg a CgaY2 próba hibridizációs képe mindkét ivarban azonos volt (B). A minták fölött a genomiális DNS hasítására használt restrikciós enzimek és a mintákhoz tartozó ivar jelzések láthatók. A membrán jobb szélén mindkét esetben 100pg PCR-rel amplifikált marker fragment (CgaY1: 1.5kb, CgaY2: 345bp) szerepel pozitív kontrollként. A próbaként használt DNS-ek DIG-jelöléssel ellátott CgaY1(A) és CgaY2 (B) fragmentek voltak. A membránok mosása az Anyag es Modszer fejezetben korábban ismertetett „szigorú” körülmények között történt 68ºC-on.

A CgaY1 markerrel végzett analízis során a marker erős hibridizációs jeleket mutatott a hím genomban, de a női genomhoz nem hibridizált (4/A. ábra). A hím genomban minden esetben több fragmentet kaptam annak ellenére, hogy a felhasznált restrikciós enzimek közül négy (Bgl II, BstE II, Not I és Pac I) nem hasítja a CgaY1 fragmentet (2. ábra). Ebből a tényből arra következtethetünk, hogy a fragment több kópiában található meg a hímivarú *C. gariepinus* egyedek genomjában (Kovács és mtsai, 2001).

A CgaY2 próbával végzett hibridizációhoz a CgaY1 esetében alkalmazottaktól részben eltérő restrikciós enzimekkel hasítottam a genomi DNS-t. A felhasznált enzimek közül öt (Bgl II, Hae III, Hha I, Msp I és Rsa I) kettévágta, míg további kettő (Alu I és Sau 3A) több helyen is hasította a vizsgált fragmentet (3. ábra). A hibridizálást követően minden esetben tiszta mintázatot kaptunk, azonban a várttól eltérően, mind a hím, mind a nő ivarú genomban azonos hibridizációs mintázat jelent meg (4/B. ábra). Mindez azt valószínűsíti, hogy a CgaY2 fragment egyetlen – de szekvencia szinten valamennyire eltérő - kópiában található meg a *C. gariepinus* faj hím és nő ivarának genomjaiban (Kovács és mtsai, 2001).

4.4 AZ IVARSPECIFIKUS MARKEREK HOMOLÓGJAINAK KERESÉSE MÁS HARCSAFAJOKBAN

Megvizsgáltam az afrikai harcsából izolált két ivarspecifikus marker konzerváltságát rokon harcsafajokban. A két ivarspecifikus markert hibridizációs próbaként felhasználva úgynevezett „zoo hibridizációt” végeztem homológ DNS szakaszok azonosítására más harcsafajok genomikus DNS-én.

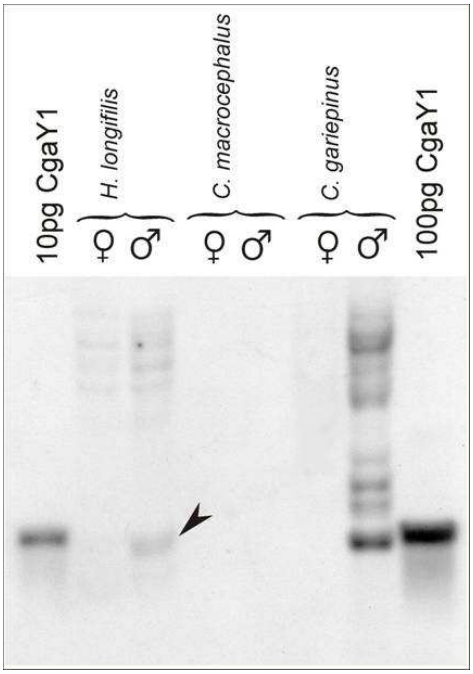
Összesen öt családba tartozó (*Clariidae, Callichthyidae, Siluridae, Ictaluridae, Pimelodidae*) tizenkét különböző harcsafaj mindkét ivarát vizsgáltam (3. táblázat) a korábban optimalizált kemilumineszcens módszer alkalmazásával szigorú és kevésbé szigorú hibridizációs körülmények között, mindkét próbával

A CgaY1 próba szigorú körülmények között nem hibridizált egyik rokon faj genomjához sem, míg kevésbé szigorú körülmények között végzett „zoo hibridizáció” feltételezett homológok jelenlétét mutatta három közeli rokon faj genomjában (*Heterobranchus longifilis; Clarias batrachus; Clarias fuscus*), míg a többi faj esetén továbbra sem kaptunk hibridizáló fragmenteket (3. táblázat).

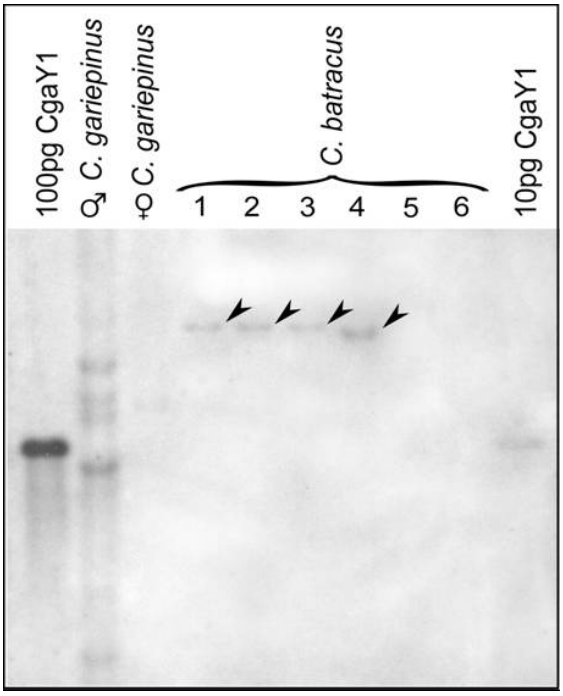
3. táblázat: A „zoo hibridizációk” során kapott eredmények összefoglalása.

CgaY1			
Család	Faj	Hibridizáló fragment mintázat	
		Szigorú körülmények	Enyhe körülmények
Clariidae	*Clarias gariepinus*	Csak a hím ivarban	Csak a hímivarban
	Clarias fuscus	-	mindkét ivarban
	Clarias batrachus	-	Csak a hímivarban
	Clarias macrocephalus	Nincs	Nincs
	Heterobranchus longifilis	Nincs	A két ivarban eltérő
Callichthyidae	*Hoplosternum thoracatum*	Nincs	Nincs
	Hoplosternum litorale	Nincs	Nincs
	Corydoras aeneus	Nincs	Nincs
Siluridae	*Silurus glanis L*	Nincs	Nincs
	Heteropneustes fossilis	Nincs	Nincs
Ictaluridae	*Ictaulurus punctatus*	Nincs	Nincs
Pimelodidae	*Phractocephalus hemiliopterus*	-	Nincs
CgaY2			
Család	Faj	Hibridizáló fragment mintázat	
		Szigorú körülmények	Enyhe körülmények
Clariidae	*Clarias gariepinus*	Mindkét ivarban	Mindkét ivarban
	Clarias batrachus	-	Mindkét ivarban
	Clarias macrocephalus	Mindkét ivarban	Mindkét ivarban
	Heterobranchus longifilis	Mindkét ivarban	Mindkét ivarban
Callichthyidae	*Hoplosternum thoracatum*	Nincs	Nincs
	Hoplosternum litorale	Nincs	Nincs
	Corydoras aeneus	Nincs	Nincs
Siluridae	*Silurus glanis L*	Nincs	Nincs
	Heteropneustes fossilis	Nincs	Nincs
Ictaluridae	*Ictaulurus punctatus*	Nincs	Nincs

A hibridizációs mintázat csak két fajban mutatott különbséget a két ivar között, mivel a *C. fuscus* esetében mindkét ivarról kapott jel ugyanazt a képet mutatta. A *H. longifilis* esetében egy 2,5 kb körüli fragment jelent meg az EcoRI restrikciós enzimmel emésztett hím genomban (5. ábra), és hasonló ivari különbség mutatkozott Bgl II enzimmel emésztett genomok között is (az utóbbi eredményt nem mutatom be).



5. ábra: Három, a *Clariidae* családba tartozó harcsafaj *Eco* RI restrikciós enzimmel emésztett DNS mintáinak CgaY1 ivarspecifikus markerrel végzett „zoo hibridizációs" mintázata.
A „zoo hibridizáció" egy lehetséges ivarspecifikus homológ jelenlétét mutatta a hím *Heterobranchus longifilis* genomban (nyíllal jelölve). A minták fölött a fajok és a mintákhoz tartozó ivarjelzések láthatók. A membrán bal szélén 10 pg, a jobb szélén 100 pg PCR-rel amplifikált marker fragment (CgaY1: 1.5 kb) szerepel pozitív kontrollként. A membrán mosása „enyhe" körülmények között történt. (2x mosó oldatban 5 perc szobahőmérsékleten és 0.5x mosó oldatban 5 perc 65 ºC-on, kétszer ismételve).



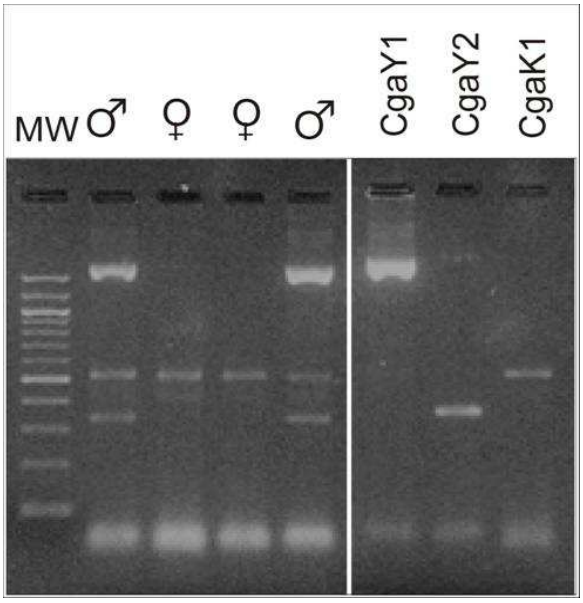
6. ábra: Zoo hibridizáció a *C. batrachus* hat növendék egyedének genomikus DNS-én a *C. gariepinus*-ra nézve hím-specifikus CgaY1 markerből készített próbával.
Eco RI restrikciós enzimmel emésztett DNS mintákon, CgaY1 ivarspecifikus markerrel végzett „zoo hibridizáció" egy lehetséges ivarspecifikus homológ szekvencia jelenlétét mutatta a négy hím egyed genomjában (nyíllal jelölve). A membrán bal szélén 100 pg, a jobb szélén 10 pg PCR-rel amplifikált marker fragment (CgaY1: 1.5 kb), a második sávban hím, a harmadik sávban nő ivarú afrikai harcsa minták láthatók kontrollként. A membrán mosása „enyhe" körülmények (2x mosó oldatban 5 perc szobahőmérsékleten és 0.5x mosó oldatban 5 perc 65 ºC-on, kétszer ismételve) között történt.

A *C. batrachus* fajból azonos körülmények között vizsgált hat növendék egyed közül négy hím egyed Bgl II enzimmel emésztett genomja esetében egy megközelítőleg 4.5 kb nagyságú hibridizáló fragment jelenlétét mutattuk ki, amely a nőivarú egyedek esetében nem jelent meg, és ugyanilyen különbséget mutatott az EcoRI enzimmel emésztett genomok esetén is (6. ábra).

A CgaY2 próba viszonylag erős hibridizációt mutatott már szigorú körülmények között is a vizsgált C*lariidae* családba tartozó fajok (*Clarias gariepinus; Clarias macrocephalus; Heterobranchus longifilis*) mindkét ivarában. A mintázatok nagyon hasonlóak voltak a *C. gariepinus*-ban kapott mintázatokhoz és nem mutattak különbséget a két ivar között (3. táblázat).

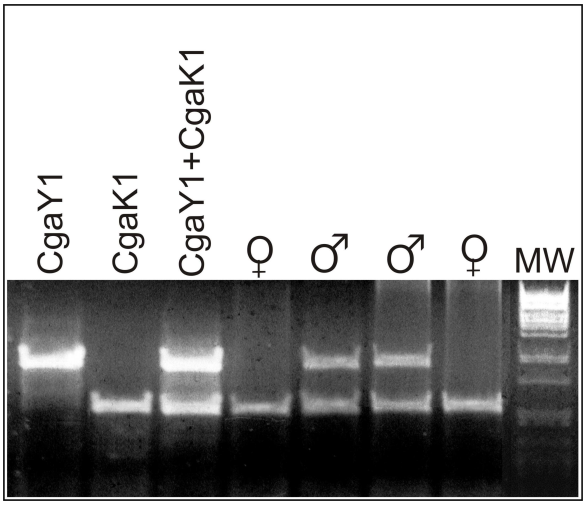
4.5 A MARKEREK PÁRHUZAMOS AMPLIFIKÁCIÓJA MULTIPLEX PCR REAKCIÓKBAN

Az egyedek szexálására alkalmas teszt kidolgozásához mind az ivarspecifikus, mind pedig a minden egyedből felsokszorozható, monomorf (kontroll) fragmenteket SCAR markerré alakítottam. Az ezekkel kialakított specifikus PCR reakcióból először duplex, majd triplex (7. ábra) PCR reakciókat hoztam létre, amelyeket Henegariu és mtsai. (1997) ajánlása szerint optimalizáltam



7.ábra: Az afrikai harcsa molekuláris szexálására alkalmas triplex PCR teszt. A két ivarspecifikus és egy kontrol marker egyszerre sokszorozható fel egyetlen triplex PCR reakcióban, amely három fragmentet amplifikál a tejes egyedekből (~1.5kb, 486 bp és 345 bp), de csak egyet, a pozitív kontrollt (486 bp) az ikrásokból. Az MW rövidítés 100 bp-os molekulasúly markert jelöl; a 2-5. sávban genomiális DNS mintákkal, a 6-8. sávban plazmid DNS mintákkal készült teszt eredménye látható.

Mivel a triplex PCR reakció a körülmények változására kissé érzékenynek bizonylut, ezért a későbbiekben a „robusztusabb” duplex PCR reakciók közül választottam ki egyet, amelyet a felhasználtunk lárvák fenotípusos ivarának előrejelzésére. Ezen teszt a hím genomból egy nagyobb ivarspecifikus és egy kisebb kontroll fragmentet sokszoroz fel: az előző a CgaY1 marker egy 1010 bp-os szakasza, míg az utóbbi a CgaK1 kontrollból származó 486 bp -os fragment (8. ábra).



8. ábra: Az afrikai harcsa molekuláris szexálására felhasznált duplex PCR teszt. A reakcióban egy ivarspecifikus és egy kontroll markerre tervezett specifikus primerpárok felhasználásával együttesen sokszorozható fel egyetlen duplex PCR reakcióban. A teszt két fragmentet amplifikál a tejes egyedekből (~1.1kb és 486 bp), de csak a pozitív kontrollt (486 bp) az ikrásokból. Az 1-3. sávban a plazmid DNS mintákkal, a 4-7. sávban genomiális DNS mintákkal készült teszt eredménye látható, míg az MW rövidítés a lambda/Pst I molekulasúly markert jelöli.

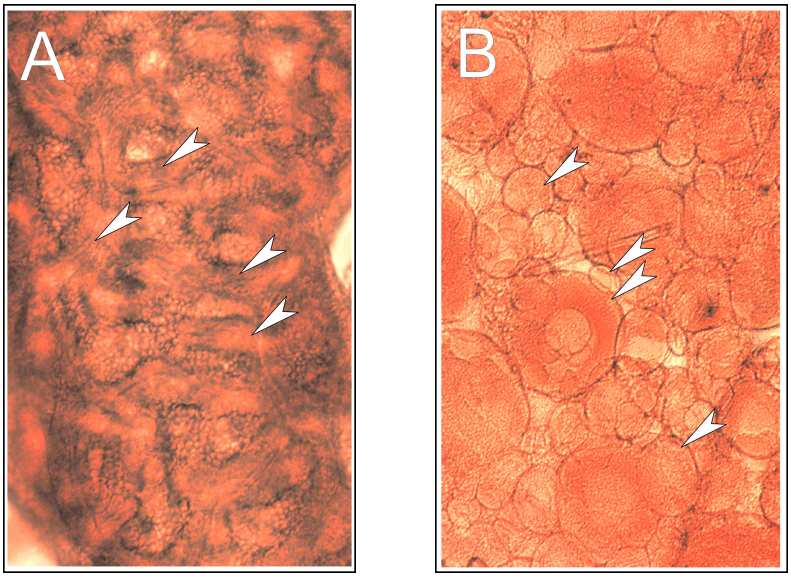
4.6 A MARKEREK ALKALMAZÁSA A FENOTÍPUSOS IVAR ELŐREJELZÉSÉRE

Megvizsgáltam a CgaY1 ivarspecifikus DNS markerrel végzett molekuláris szexálási eljárás gyakorlati alkalmazhatóságát is egy a Szarvas Fish Kft-től származó, véletlenszerűen kiválasztott tenyészpár utódain. A lárvákat a megtermékenyítést követő 3-5 héten szexáltam, a már korábban ismertetett specifikus SCAR primerekkel kialakított, stabilan működő duplex PCR reakcióval, amely a CgaY1 marker, valamint a CgaK1 kontrol fragment megfelelő szakaszát amplifikálja fel (8. ábra). A markertesztek során a vizsgálati csoportban megállapított genotípusos ivararány 50-50%-nak adódott (143 tejes/145 ikrás). A lárvákat a molekulári szexálással kapott eredmények alapján hím- és nőivarú csoportokra osztottam szét.

Az ivar szerint csoportosított egyedeket öt hónapon át neveltem, ezalatt a tejesekből 16 (11%), míg az ikrások közül 13 (9%) pusztult el. A nevelési időszak végén 40-40 egyedet mindkét ivarból random módon kiválasztottam és egy másik kísérlet céljaira elkülönítettem (ezen egyedek az értékelésben nem szerepelnek). A megmaradt 87 tejes és 92 ikrás egyed fenotípusos ivarát szövettani vizsgálattal ellenőriztem, a 9. ábra az ezen vizsgálat során kapott eredményekre mutat tipikus példákat.

A szövettani vizsgálatok során a molekuláris teszt alapján hímnek előrejelzett 87 túlélő egyedből 80 egyed fenotípusa megegyezett azzal, amit a molekuláris szexálás előrejelzett, míg 7 egyed fenotípusosan nőivarúnak bizonyult. A 92 ikrás genotípusúként azonosított egyedből mindössze 2 egyed volt fenotípusosan tejes.

A markerteszt eredményétől eltérő ivar fenotípust mutató egyedekből a szövettani vizsgálatok során újabb mintavételt végeztem és ezeket ismételt markertesztben vizsgáltam duplex PCR reakcióval. Ennek során hét, a korabbi markertesztben hímként azonosított, de fenotípusosan ikrás egyed közül 5 ismételten hím genotípust mutatott és csak két esetben kaptam a korábbi vizsgálatokétól eltérő eredményt. A markerteszt alapján ikrásnak, de fenotípusosan tejesnek azonosított két egyed közül az egyik a korábbival azonos ikrás, míg a másik attól eltérő hím genotípust mutatott.



9. ábra: Hím (A) és nőivarú (B) *Clarias gariepinus* egyedek gonádjának elvékonyított kenetei. Acetocarmin festést követően (100x nagyítás) az előbbin a herecsatornácskák (nyíllal jelölve), míg az utóbbin különböző fejlettségű oociták (nyílheggyel jelölve) figyelhetők meg .

Az adatok szerint tehát az első molekuláris szexálás 179 egyedből 170 esetében (95%) helyesen jelezte a fenotípusos ivart, míg a megismételt teszttel a kilenc eltérést mutató egyedből három (két tejes és egy ikrás) esetében sikerült az első tesztreakció hibáját javítani. Így összességében a molekuláris szexálási reakció hatásfoka közel 97%-osnak bizonyult (4. táblázat).

4. táblázat: A CgaY1 marker alkalmazása ivar előrejelzésére egy random kiválasztott tenyészpár utódain.

Ivar	Egyedszám	Helyesen szexálva	Százalékos arány
Tejes	87	82	94,2 %
Ikrás	92	91	98,9 %
Összesen	179	173	96,6 %

4.7 MIKROSZATELLIT SZEKVENCIÁK AZONOSÍTÁSA HOMOLÓG-KERESÉS SORÁN

Kísérletet tettem a CgaY1 marker *Clarias batrachus*-ban megtalálható feltételezett homológjának izolálására is. Ehhez egy részleges genomikus plazmid könyvtárat hoztam létre, amelyet kolónia hibridizációval teszteltem, a zoo blottnál leírt „kevésbé szigorú" hibridizációs körülmények között. A hibridizációban szereplő mintegy 6500-7000 db kolóniából a hibridizációs jelek erőssége alapján 96 db-ot választottam ki további vizsgálatra.

A kiválasztott kolóniákból az inszertet kolónia-PCR-rel felsokszoroztam majd mindkét irányból szekvenáltam. A szekvenciák összehasonlítását követően összesen 78 különböző szekvenciát azonosítottam, amelyek közül 55-nek a teljes szekvenciáját határoztam meg, 23 esetében, pedig csak a határoló szekvenciák kerültek meghatározásra. A klónok közül a CgaY1 szekvenciához leginkább hasonlónak (57%-os egyezés) az A08-as klón bizonyult (Mellékletek: M6), de sem ez, sem a többi 38 tesztelt klón, amelynek szekvenciáira specifikus primereket terveztem, nem mutatott különbséget a két ivar között, poolozott DNS-en végzett PCR reakciókban.

Ugyanakkor a meghatározott szekvenciák közül 21 mikroszatellit típusú bázispár ismétlődéseket tartalmazott (Mellékletek: M8). Ezek közül 18 volt alkalmas arra, hogy specifikus primerpárok tervezésével mikroszatellit markerré alakítsuk őket (5. táblázat; Mellékletek: M7; M8). A gazdafajban 16 mikroszatellit volt polimorf míg 15 specifikus fragmenteket amplifikált legalább egy rokon fajban, tizenhárom pedig legalább háromban a vizsgált fajok közül (Yue es mtsai, 2003).

5. táblázat: Homológ-keresés során azonosított *Clarias batrachus* mikroszatellit markerek leírása.

Azonosító	Ismétlődés	Termék (bp)
*Cba*01	$(GC)_2(AC)_{15}$	246
*Cba*02	$(AC)_{16}$	178
*Cba*03	$(GGA)_5$	117
*Cba*04	$(AC)_{19}$	183
*Cba*05	$(GT)_8$	150
*Cba*06	$(CAA)_7$	210
*Cba*07	$(TG)_8(CG)_4$	215
*Cba*08	$(CA)_{16}$	153
*Cba*09	$(CA)_4GTTGCA\text{-}C(GT)_{10}$	134
*Cba*10	$(GT)_{16}$	119
*Cba*11	$(TG)_{13}$	250
*Cba*12	$(TG)_9GA(TG)_6$	138
*Cba*13	$(TGTA)_3\,C(TGTA)_5$ $C(TGTA)_2(TG)_6\,(TA)_3$	251
*Cba*14	$(CA)_{16}TA(CA)_2$	177
*Cba*17	$(CA)_{16}GA(CA)_2$:	210
*Cba*19	$(TG)_{26}$	252
*Cba*20	$(TC)_6GC(TC)_2$	95
*Cba*21	$(GT)_6$	129

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1 IVARHOZ KAPCSOLT DNS MARKEREK KERESÉSE HALAKBAN

Ivarspecifikus DNS markereket kerestünk öt, a *Clariidae* családba tartozó harcsafaj, valamint a pontyfélékhez tartozó compó genomjában. Vizsgálatainkhoz a Michelmore és mtsai. (1991) által kidolgozott eljárást („bulk segregant analysis") választottuk, amely leegyszerűsíti az egy adott fenotípusos tulajdonsághoz kapcsolt markerek azonosítását. A vizsgált tulajdonságra nézve különbséget hordozó (heterozigóta) szülőkpártól származó egyedekből izolált DNS mintákat az egyedek fenotípusa (jelen esetben ivara) alapján csoportosítva (összekeverve, „pool"-ozva) lehet analizálni. Az így kialakított csoportokban az egyedek közötti random különbségek „kihígulnak", míg a szelekció alapjául szolgáló fenotípusok közötti különbségek megmaradnak, „felerősödnek". Így a két csoport között található különbségek nagyobb valószínűséggel mutatnak a kiválasztott fenotípussal kapcsoltságot. A pool-ok közötti különbségek keresésére RAPD analízist (Welsh and McClelland, 1990; Williams és mtsai., 1990; Williams és mtsai., 1993b) használtunk, mivel ez a technika lehetővé teszi olyan genomok vizsgálatát is, amelyekről semmilyen előzetes információval nem rendelkezünk. Emellett további előnye, hogy a genomok egyszerre több ponton vizsgálhatók vele minden reakcióban, költségei pedig viszonylag alacsonyak.

Az általam végzett vizsgálatokban a felhasznált DNS minták, a *Clarias gariepinu*s és a *Heterobranchus longifilis* fajok kivételével, random módon kiválasztott egyedekből származtak. Az afrikai harcsa egyedek egy több beltenyésztési lépésen átesett tenyészállomány egyedei, a *Heterobranchus longifilis* egyedek pedig testvérek voltak. Igen nagy különbség volt az egyes poolokban szereplő egyedi DNS minták számát illetően is, aszerint, hogy az analízis végzésekor hány egyed állt a rendelkezésünkre. Ennek megfelelően igen nagy változatosságot tapasztaltam az elsődleges analízis során talált feltételezett markerek számát illetően is az egyes vizsgált fajokban. A tíznél kevesebb egyed mintáiból kialakított poolok esetében mintegy megduplázódott azoknak a feltételezett markereknek az aránya, amelyek ivarhoz kapcsoltsága a későbbi egyedi mintákon végzett analízisek során nem igazolódott be, mivel az egyedi DNS mintákból származó random különbségek nem hígultak ki kellő mértékben.

Tapasztalataimmal összevetve az eredményeket megállapítható, hogy legalább 8-10 egyedből származó DNS-t tartalmazó csoportosított minták használata ajánlott az analízisek során.

Annak ellenére, hogy az ilyen megközelítés bizonyítottan alkalmas ivarspecifikus markerek keresésére, hiszen korábban növényekben (Mandolino és mtsai., 1999; Martinez és mtsai., 1999; Reamon-Buttner és mtsai., 1998; Zhang és mtsai., 1998) és állatokban is (Bello és Sanchez, 1999; Griffiths és Orr, 1999; Lessells és Mateman, 1998) egyaránt sikeresen alkalmazták, az általam vizsgált hat fajból csak egy esetében vezetett eredményre. Ehhez hasonló eredményekről más szerzők is beszámoltak például az atlanti lazac (McGowan és Davidson, 1998) vagy *Tetraodon nigroviridis* (Li és mtsai., 2002) esetében. Ezen eredmények és más halfajokon elvégzett hasonló kísérletek (Genhua Yue, személyes közlés), valamint a saját tapasztalataim alapján úgy tűnik, hogy ha két-háromszáz primerrel végzett vizsgálat nem vezet eredményre, akkor valószínűtlen, hogy további primerek tesztelése megérné az erőfeszítést.

A megtalált markerek kis számára és a fajonkénti hatékonyság vártnál alacsonyabb értékére több tényező is magyarázatot adhat. Egyrészről a halak ivarmeghatározása meglehetősen plasztikus és másodlagos tényezők (módosító gének, környezeti hatások) is befolyásolhatják, amelyek a fenotípusos ivar megváltozásához vezetnek. Ilyen egyedek jelenléte a vizsgálati állományokban jelentősen megnehezítheti, vagy lehetetlenné teheti ivarspecifikus markerek azonosítását az általunk használt eljárással. Másrészről egyre több bizonyíték lát napvilágot, amelyek azt igazolják, hogy a halak ősében a többi gerinces ősétől való elválás után egy extra genomduplikáció zajlott le (Wittbrodt és mtsai., 1998; Meyer 1999; Aparicio, 2000; Nonaka, 2001), amelyet követően a megduplázódott genom csak részben eliminálódott, míg a fennmaradó rész darabjai a genom újrarendeződése során különböző kromoszómákra transzlokálódva fennmaradhattak. Ennek során feltehetően az ivari kromoszómák őseiből származó darabok is átkerülhettek autoszómákra. Így az ivari kromoszómák egyes szakaszainak homológjai nem csak az ivari kromoszómákon, hanem autoszómákon is jelen vannak. Az ilyen szekvenciák csak akkor alkalmasak ivari különbségtételre, ha az ivarhoz kötött homológ valamilyen módszerrel elkülöníthető a többi homológtól, ellenkező esetben az ilyen szakaszokról képződő RAPD mintázat nem lesz eltérő a ket ivarban.

Ugyanakkor a komplex, többé-kevésbé módosult ivari kromoszómákat (lásd 2.2.2.1. fejezet) tartalmazó kromoszómarendszer is

megnehezítheti a marker azonosítás feladatát, ha nincs lehetőség a különböző kromoszómatípusok előzetes elkülönítésére.

Az előzetes citológiai ismeretek alternatívájaként összehasonlító genom hibridizációból (Traut és mtsai., 1999) is származhatnak az ivari kromoszómák létezésére utaló információk, feltéve, hogy az ivari kromoszómák között nagy mértékű differencia van, de andro- és gynogenetikus kísérletek, valamint ivarátfordítások segítségével is bizonyítható az ivari kromoszómákon alapuló ivarmeghatározás jelenléte (Yamamoto, 1955; Golovinskaya, 1968; Horváth és Orbán, 1995).

További segítséget és előzetes információt nyújthat az ivarspecifikus markerek kereséséhez, a kísérleti populáción, fajon, vagy közeli rokon fajon belüli várható ivararány ismerete is, mivel a komplex ivari kromoszóma rendszerek, illetve a polifaktoriális ivarmeghatározás és különböző környezeti hatások is okozhatnak erősen eltolódott ivararányt (pl.: ivarátfordulást), de a szekvenciális hermafrodita fajok esetében is gyakori a domináns ivar alacsony egyedszáma (lásd 2.2.1 és 2.1.3 fejezetek). Az első két esetben jelentősen csökken a markerkeresés eredményességének esélye, a valódi hermafrodíták esetében pedig nem is várható siker, mivel nincs genetikai különbség az ivarok között. Ugyanakkor több generációs, stabilan öröklődő 1:1 ivararány esetén feltételezhető a gonokronisztikus ivarmeghatározás és több-kevesebb különbség az ivarok genetikai anyagában (az általunk vizsgált populációk közül csak a *C. gariepinus* és a *H. longifilis* esetén volt ismert a populációk stabil 50-50%-os ivararánya).

Az ivarspecifikus DNS markerek izolálásához a legnagyobb sikerrel az azonosított, és jelentős méretkülönbséget mutató ivari kromoszómákkal rendelkező stabil gonokronisztikus fajok kecsegtetnek.

5.2 A CLARIAS GARIEPINUS-BÓL IZOLÁLT KÉT IVARSPECIFIKUS MARKER

A különböző ivari DNS poolokon végzett összehasonlító RAPD vizsgálataink során a harcsafélékhez tartozó *Clarias gariepinus* fajban két, a hím ivarra nézve specifikus fragmentet azonosítottunk. A két fragmentet izoláltam, klónoztam és meghatároztam bázissorrendjüket.

A markerek szekvenciáját az adatbázisokhoz hasonlítva jelentős DNS-szintű homológiákat egyik fragment esetében sem találtam. Ugyanakkor figyelemre méltó, hogy a CgaY1 marker 3' vége fehérje szinten alacsony fokú hasonlóságot mutatott tirozin foszfatáz (*PTP vagy PTEN*) génekkel, amelyek emlősökben hormonális szabályozás alatt állnak (Mauro és mtsai., 1994) és néhány közülük specifikusan a tesztiszben expresszálódik (Kaneko és mtsai., 1993; Ohsugi és mtsai., 1997; Tokuchi és mtsai., 1999). Ezek a gének feltehetően szerepet játszanak a tesztisz fejlődésében (Ohsugi és mtsai., 1997). Az irodalomban számos TPT-szerű transzmembrán foszfatáz ismert, amelyek közül az egyiket az emberi genomban az Y kromoszómára térképezték (Chen és mtsai., 1999).

A CgaY2 marker egy *Fugu rubripes*-ből származó reverz transzkriptázzal (Poulter és mtsai., 1999) mutatott 470 bp-os szakaszon alacsony mértékű hasonlóságot. Az ehhez hasonló virális, vagy inszerciós elemekből származó evolúciósan visszamaradt degradálódott szekvenciák viszonylag gyakoriak minden eukarióta genomban. Azonban igen kevés működőképes ezekből a génekből, inkább csak az evolúció genetikai fosszíliáinak tekinthetők (Goodier és Davidson, 1994).

Nem meglepő, hogy a kontroll szekvencia nem mutatott jelentős homológiát sem DNS, sem pedig fehérje szinten, hiszen az eddig megszekvenált eukarióta genomok többségének kevesebb, mint 5%-a tartozik a kódoló régióba (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), és tudomásom szerint az eddig klónozott és szekvenált RAPD markerek közül mindössze egy *Penaeus vannamei*-ből izolált fragmentről írták le, hogy kódoló régióból, egy ATPáz-zal rokon szekvenciából származik (Garcia és mtsai., 1996).

E munkát megelőzően mindössze egyetlen közlemény jelent meg, amely halakon végzett RAPD kísérletekből származó ivarspecifikus markerről számol be, ezt Iturra és mtsai. (1997) izolálták szivárványos pisztrángból. Így a mi markereink a második és harmadik, csoportosított DNS mintából izolált ivarspecifikus markerek halakban. Mi több, a CgaY1 és a CgaY2 az első ivarspecifikus DNS markerek voltak, amelyek a harcsafélékből származnak, jóllehet nem sokkal ezeket követően Waldbieser és mtsai. (2001) törpeharcsából (*Ictalurus punctatus*) is leírtak ivarhoz kötötten öröklődő mikroszatellit markereket.

5.3 A MARKEREK IVARSPECIFIKUSSÁGÁNAK RÉSZLETES VIZSGÁLATA

Mindkét, a *Clarias gariepinus*-ból azonosított RAPD marker esetében további vizsgálatokat végeztem azok ivarspecifikusságának ellenőrzésére. Ennek során az eredeti RAPD primerek felhasználásával, később pedig a megismert szekvenciák alapján tervezett SCAR primerekkel végeztem ellenőrző PCR reakciókat újabb egyedeken. Összesen 40-40 egyedet vizsgáltam meg az egyes ivarokból, amelyek közül 20 a Szarvas Fish Kft-től és 20 a tukai Intenzív Haltenyésztő Kft-től származott. A CgaY1 marker mindkét mintacsoportban, mind a RAPD, mind a SCAR vizsgálatok esetén valamennyi vizsgált hím egyedben megjelent, míg a CgaY2 marker kettő egyednél hiányzott. Ugyanakkor egyik marker sem volt kimutatható egyetlen ikrás egyednél sem.

Az ivarhoz kötött öröklődés további igazolására Southern hibridizációval is végeztem vizsgálatokat. Ennek során mindkét markernél több restrikciós enzimet használtam, amelyek egy része, az izolált markerek szekvenciáját is hasította. Szigorú körülmények között a CgaY1 marker csak az afrikai harcsa hímek genomjához hibridizált, de azoknál a restrikciós enzimeknél is több fragment volt kimutatható, amelyek az izolált marker szekvenciáját nem hasították. Ez a tény arra enged következtetni, hogy a fragment itt több kópiában található meg. Ugyanakkor kevésbé szigorú körülmények között mindkét ivarban megjelentek gyengén hibridizáló fragmentek, miközben az ivarspecifikus mintázatbeli különbség megmaradt. Ennek alapján feltételezhető, hogy a faj genomjában jelen vannak távoli homológok, amelyek a másik ivari kromoszómán, vagy valamelyik autoszómán helyezkednek el.

Meglepő, hogy a CgaY2 marker esetében a Southern hibridizáció nem mutatott ivarspecifikus mintázatbeli különbséget egyetlen restrikciós enzimmel emésztett genom esetén sem, miközben RAPD-dal és specifikus primerekkel vizsgálva csak a hím genomból sokszorozható fel. Ennek lehetséges oka, hogy a hím ivarspecifikus fragment legalább egy homológja jelen van a nőivarú genomban, de a fragment egyik vége hiányzik, egy deléció következtében. Ezért különbség mutatkozik a PCR-rel amplifikált termékekben, de nincs különbség a Southern hibridizációs mintázatban, ha a deléció nem csak a RAPD primer, hanem az egyik specifikus primer feltapadási helyét is tartalmazza (ez mindössze 25 bp-os távolság). Ugyanakkor a deléció nem lehet túl nagy, mert ebben az esetben a hibridizáló fragmentek mintázatában is különbséget kellene találnunk.

5.4 A CGAY1 ÉS CGAY2 MARKEREK LEHETSÉGES HOMOLÓGJAI ROKON FAJOKBAN

Irodalmi adatok szerint ezidáig valamennyi, a halaknál ismert ivarspecifikus DNS markerek közül, mindössze egyetlen egyről derült ki, hogy több fajban is ivarhoz kötötten található meg. Ez a marker egy a „chinook" lazacból izolált (Du és mtsai., 1993) növekedési hormon génnel rokonságot mutató (GH-2) pszeudogén, azonban ez is csak kizárólag *Oncorhynchus* genushoz tartozó fajokban tűnik Y kromoszómához kapcsoltnak (Forbes és mtsai., 1994; Nakayama és mtsai., 1999).

Remélve, hogy ehhez hasonló eredményeket kapunk a harcsafélék öt családjában tartozó fajokon, vizsgáltam a markerek jelenlétét zoo hibridizációval. A tizenkét közelebbi és távolabbi rokon faj közül, mindkét marker esetében csak a *Clariidae* családba tartozó fajokban sikerült kimutatni feltételezett homológok jelenlétét.

A CgaY2 marker a családba tartozó valamennyi vizsgált faj mindkét ivarához hibridizált, és a *C. gariepinus*-hoz hasonlóan nem mutatott különbséget az ivarok között. Ugyanakkor a CgaY1 próba nem hibridizált a családba tartozó *C. macrocephalus* faj genomjához, és hibridizációs mintázata a többi ide tartozó faj esetén is csak kevésbé szigorú körülmények között volt kimutatható. A mintázatok fajonként is eltérő képet mutattak. A *C. fuscus*-ban nem mutatkozott különbség a két ivarban, míg a *C. batrachusban* csak a hím ivarú egyedekből mutatott ki egyetlen homológ fragmentet, a *H. longifilis* esetében pedig mindkét ivarban jelen volt, ám eltérés mutatkozott az ivarok között egyetlen, markerként is felhasználható fragmentben, amely csak a hím egyedek mintáiból mutatható ki. Fontos megjegyezni, hogy erős jeleket csak a *C. gariepinus* hím egyedeinek mintáiban kaptunk, még engedékeny hibridizációs körülmények között is, ami arra enged következtetni, hogy ez a marker hasonlósága a más fajokban található, feltételezett homológokkal nem igazán magas fokú.

A CgaY1 marker „zoo hibridizációs" eredményei fogódzót nyújthatnak a családba tartozó fajok evolúciós, rokoni kapcsolatára vonatkozóan is. Eredményeink arra utalhatnak, hogy a *C. gariepinus* faj ivari kromoszómája nagyobb fokú hasonlóságot mutat az ivarspecifikus mintázatot adó *H. longifilus* és *C. batrachus* fajokéval, mint a *C. fuscus*–éval, amelyben szintén jelen vannak homológ fragmentek, de nem nemhez kötötten. A fenti gondolatmenetet folytatva az afrikai harcsa ivari

kromoszómája a legtávolabbi rokonságban feltételezhetően a *C. macrocephalus*-ával van, mivel itt egyetlen homológ sem volt kimutatható. Ugyanakkor szem előtt kell tartani, hogy az egyes fajokban található különbségek a fajok evolúciós szétválását követően is kialakulhattak, eltüntetve a közelebbi rokonságra utaló jeleket. Éppen ezért ezek az itt vázolt feltételezéseket csak más, evolúciós kapcsolatokat célzó vizsgálatok eredményeivel összevetve szabad alkalmazni.

5.5 AZ AFRIKAI HARCSA IVARI KROMOSZÓMARENDSZERE XX/XY TÍPUSÚ

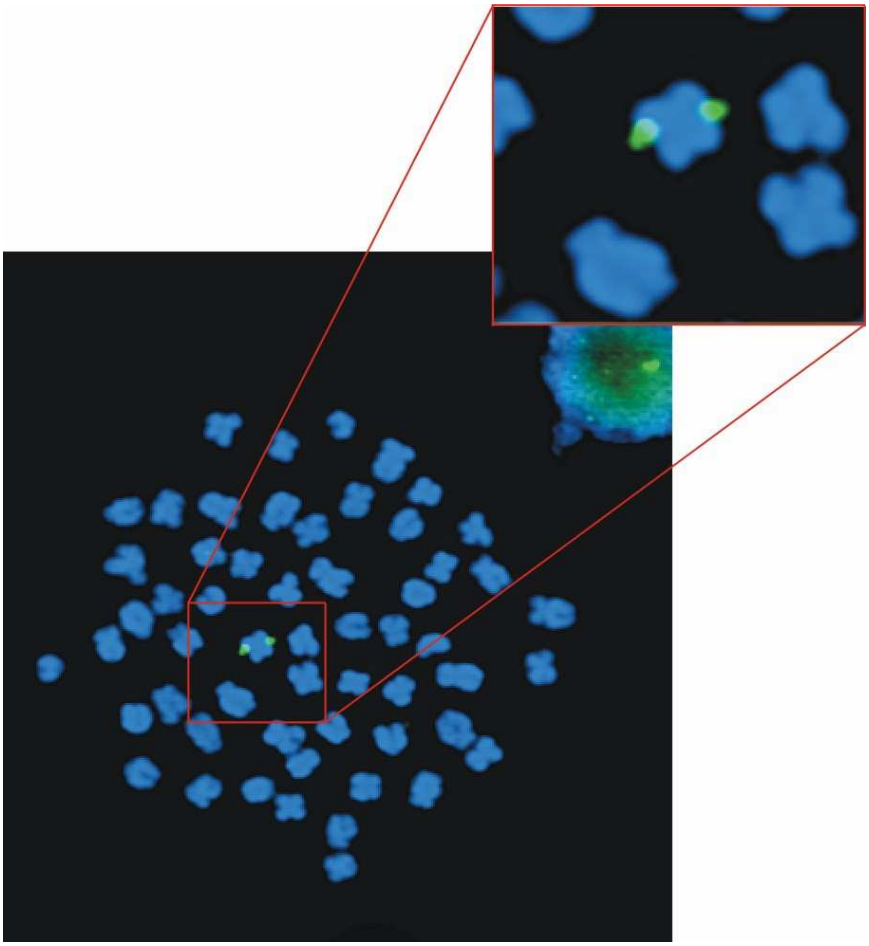
Az afrikai harcsát kedvező tulajdonságai miatt viszonylag gyakran használják modellállatként a biológiai kutatásokban. Korábban számos genom manipulációt és hormonális ivarátfordítást célzó kísérletben is szerepelt, azonban ezekből a kísérletekből csak közvetett bizonyítékok utalnak a faj ivari kromoszómarendszerére. Az ezekből levont következtetések meglehetősen ellentmondóak. Néhány közülük arra utal, hogy XX/XY kromoszóma rendszer van a fajban, míg mások ettől eltérően a ZZ/ZW kromoszóma rendszer jelenlétét valószínűsítik (lásd: 2.2.4. fejezet). A faj kromoszóma rendszerére vonatkozó következtetéseket tovább nehezíti, hogy a harcsafélék között mind hím heterogametikus (Davis és mtsai., 1990; Le Grande, 1981), mind nő heterogametikus (Agnese és mtsai., 1990; Andreata és mtsai., 1993; Pandey és Lakra, 1997) ivari kromoszóma rendszereket tartalmazó fajokat írtak le korábban.

Az általunk azonosított ivarspecifikus DNS markerek és a velük elvégzett kísérletek ugyanakkor közvetlen bizonyítékokat szolgáltatnak arra vonatkozólag, hogy az afrikai harcsa genetikailag meghatározott ivardeterminációval rendelkezik, amely az XX/XY ivari kromoszómarendszert követi és nem a ZW/ZZ rendszert.

Ezt a következtetést tovább erősítik az általunk izolált hím-specifikus CgaY1 markerrel együttműködőnk, Catherine Ozouf-Costaz (Természettudományi Múzeum, Párizs, Franciaország), által végzett kromoszóma hibridizációs vizsgálatok („Fluorescent *In Situ* Hybridization"). E kísérletekben a CgaY1 marker a faj 56 kromoszómájából csak a hím kromoszómakészlet egyetlen metacentrikus kromoszómájához (mindkét karon ugyanazon pozícióhoz) hibridizált (10. ábra), annak kromoszómapárjához nem és a nő ivarban sem adott jelet. A

CgaY2 markerrel nem sikerült jelet kapnia, feltehetően annak alacsonyabb kópiaszáma és a fragment kisebb mérete miatt.

A „zoo hibridizációk” eredményei szintén tovább erősítik ezt a következtetést, mivel két közeli rokon fajban is jelzik hím ivarspecifikus homológok esetleges meglétét, amiből ezen fajokban szintén XX/XY kromoszómarendszer megléte feltételezhető.



10. ábra: CgaY1 markerrel végzett FISH kromoszóma hibridizáció, hím *C. gariepinus* kromoszóma készletén**.** A CgaY1 próba egyetlen metacentrikus kromoszómához hibridizál (a hibridizációt Catherine Ozouf-Costaz végezte a párizsi Természettudományi Múzeumban).

5.6 MIROSZATELLIT SZEKVENCIÁK A CLARIAS BATRACHUS GENOMJÁBÓL

Az azonosított homológok izolálásával feltehetően olyan további ivarspecifikus markerek lesznek izolálhatók, amelyek mind kutatási, mind pedig gyakorlati szempontból érdekes információkkal egészíthetik ki ismereteinket. Ezért kísérletet tettem a CgaY1 marker *Clarias batrachus*-ban megtalálható homológjának izolálására. Ehhez egy részleges genomikus plazmid könyvtárat hoztam létre, amelyet hibridizációval teszteltem. A hidridizációs jelek alapján kiválasztott klónok közül egy sem mutatott nagyfokú hasonlóságot a CgaY1 szekvenciával. Ugyanakkor a szekvenciák számítógépes analízise során 21 db mikroszatellit típusú ismétlődő DNS szakaszt találtam, amelyek közül 18 volt alkalmas arra, hogy mikroszatellit markerré alakítsuk őket.

A fenti mikroszatellit markerek működőképességét együttműködőm, Genhua Yue (Temasek LifeSciences Laboratory, Szingapúr) tesztelte a *Clarias batrachus* fajon, valamint további három családba tartozó hat harcsa fajon. A mikroszatellitek határoló régióira tervezett primerpárok közül 15 specifikus fragmenteket amplifikált legalább egy rokon fajban, tizenhárom pedig legalább háromban a vizsgált fajok közül (Yue es mtsai, 2003). Érdekességként szeretném megemlíteni, hogy a fragmentek szekvenciáinak vizsgálatából kiderült, hogy azok nem minden esetben homológjai az eredeti szekvenciáknak.

Az általam izolált mikroszatellit markerekkel lehetőség nyílhat több *Clarias* faj genetikai analízisére. Alkalmazhatóak például genetikai térképek készítésére, származásellenőrzési és öröklődési vizsgálatokra, populációk genetikai analízisére vagy fajták és vonalak megkülönböztetésére, de felhasználhatóak egyedi azonosításra, vagy a családba tartozó fajok evolúciós rokonsági fokának részletesebb és pontosabb vizsgálatára is.

5.7 GYAKORLATI HASZNÁLATRA ALKALMAS MOLEKULÁRIS SZEXÁLÁSI ELJÁRÁS KIDOLGOZÁSA

A rendelkezésünkre álló ivarspecifikus markerek birtokában indokoltnak tűnt azok gyakorlati alkalmazhatóságának lehetőségét is megteremteni. Tapasztalataik szerint a RAPD technika érzékeny a reakció körülményekre (pl. a DNS minőségére, a reakció sebességére, a használt készülék sajátságaira), és az egyedi minták vizsgálatakor tapasztalható

esetleges lényeges mintázatbeli különbségek is jelentősen megnehezíthetik az mintázatok kiértékelését. A korábban *Xiphophorus maculatus*-nál és Chinook lazacnál (*Oncorhynchus tshawytscha*) kialakított PCR alapú teszt eljárásokhoz (Coughlan és mtsai., 1999; Devlin és mtsai., 1994) hasonló teszt kidolgozására volt lehetőség. Ezért az ivarspecifikus markereket és a korábban izolált kontroll fragmenteket SCAR marerekké alakítottam, amelyekkel duplex és triplex PCR reakciókat dolgoztam ki az egyedi minták tesztelésére.

A triplex reakció a hím genomból összesen három (két ivarspecifikus és egy kontroll) fragmentet sokszoroz fel, míg a duplex reakció egy ivarspecifikus és egy kontrol fragmentet amplifikál. A nőivarú genomból viszont mindkét reakció csak a kontroll fragment jelenlétét mutatja.

A kontroll és ivarspecifikus markerek együttes felsokszorozása, könnyen értékelhető és felhasználóbarát módon teszik lehetővé a faj egyedeinek molekuláris szexálását, bár tapasztalatom szerint a triplex reakció tömeges alkalmazás során nem bizonyult eléggé megbízhatónak, azaz nem minden esetben amplifikálta fel a várt termékeket. Ezért alkalmazása esetén szükséges a protokollok nagyon pontos betartása. A hétköznapi gyakorlat számára véleményem szerint alkalmasabb az egyszerűbb, kevésbé érzékeny duplex-teszt.

5.8 A GYAKORLATI FELHASZNÁLÁS TAPASZTALATAI

Megvizsgáltam a kidolgozott tesztrendszer hatékonyságát a kifejlett korú egyedek fenotípusos ivarának lárvakori előrejelzésére is. Ennek során egy keresztezés utódnemzedékében duplex PCR reakcióval (CgaY1és CgaK1 markerek felhasználásával) előre jeleztem az egyedek várható fenotípusos ivarát három hetes korban, majd a két ivart egymástól elkülönített csoportokban neveltem öt hónapos korig. Ekkor a gonádok fejlettsége még nem tette lehetővé az ivarszervek egyszerű makroszkópos, vizuális azonosítását, de a szöveti differenciálódás már megtörtént az egyedekben. Ezért valamennyi egyed ivarszervéből szövettani vizsgálatokat végeztünk, amellyel egyértelműen elkülöníthető a hím és női ivarszerv.

A szövettani vizsgálatok eredményét összevetve az előrejelzések adataival megállapítható, hogy az általam izolált hím-specifikus DNS markerrel végzett molekuláris teszt 96,6 %-os hatékonysággal volt alkalmas a fenotípusos ivar előrejelzésére.

Rendkívül érdekes, hogy a vizsgált egyedek 3,4 %-ánál az előrejelzett genotípusos ivar eltért a visszaellenőrzött fenotípus ivartól, noha korábban más populációkból származó 80 egyed vizsgálata során a CgaY1-es markerrel nem tapasztaltunk eltérést a genotípusos és fenotípusos ivar között. Az eltérésre több lehetséges magyarázat adható.

Egyik lehetséges magyarázat, hogy rekombináció zajlott le az ivari kromoszómák között a marker és az ivardeterminálló faktor közötti szakaszon. Ha elfogadjuk a feltételezést, mely szerint az eltérés rekombinációs eseményeknek köszönhető, akkor feltételeznünk kell azt is, hogy a rekombinánsok nem vagy csak igen kevéssé szaporodóképesek, és ezért nem terjednek el jobban a populációban. Amennyiben valóban rekombináció okozta az eltérést, úgy az is feltételezhető, hogy a marker az ivardeterminálló régiótól mindössze 3,4 cM távolságban található. Azonban ennek igazolása csak újabb, a rekombináció gyakoriságát és a az ivarérett rekombináns egyedek termékenységet vizsgáló keresztezések révén lenne lehetséges.

Irodalmi adatokból ismert a halak ivardeterminációs és a korai differenciációs mechanizmusának érzékenysége, amely lehetővé teszi a genetikailag meghatározott ivar mesterséges felülbírálatát, a hormonkezeléssel végzett ivarátfordítást (Pandian és Koteeswaran, 1998). Számos halfajnál természetes körülmények között is történhet fenotípusos ivarátalakulás szociális és más környezeti faktorok hatására akár kifejlett egyedeknél is (Badura és Friedman, 1988; Shapiro, 1992; Harry és mtsai., 1992). Mindezek alapján elképzelhető, hogy a genotípusos és fenotípusos ivar közötti eltérés ennél a néhány egyednél is ivarátfordulás eredménye lehet, ami esetleg a felnevelés során kialakított egyivarú populáció normálistól eltérő szociális körülményeinek hatására jött létre. Ennek a feltételezésnek az igazolása azonban csak az egyedek felnevelését követően lett volna lehetséges, ha az ilyen egyedeket normál egyedekkel keresztezve vizsgálnánk az utód populációk ivari eloszlását, azonban a kérdéses egyedeket az ivarszerv vizsgálatához fel kellett aldoznunk.

Az előrejelzéstől eltérő fenotípust mutató egyedeket újra megvizsgálva az összes vizsgált egyedhez viszonyítva mindössze az esetek 1,7 %-ában bizonyult eltérőnek az eredeti markerteszt eredménye. Ez az eltérés következhet a teszt eredményének hibás értékeléséből, de szintén lehet a felnevelés során történt esetleges keveredés következménye is.

5.9 JAVASLATOK AZ IVARSPECIFIKUS MARKEREK HASZNOSÍTÁSÁRA

Az ivarspecifikus markerek felhasználására számos potenciális lehetőség van mind az alkalmazott, mind pedig az alapkutatásban. Az *in vivo* mintavétel lehetséges már nagyon korai fejlődési stádiumban (Kawakami és Hopkins, 1996), vagy reprezentatív minta gyűjthető embrió/lárva stádiumban a populációk ivararányának vizsgálatára, akár pár órával a megtermékenyítést követően is. A molekuláris szexálás lehetővé teszi az andro- vagy gynogenezis és a hormonális ivarátfordítás eredményességének korai igazolását anélkül, hogy ki kellene várni az utódok ivarérettségét, ami egy generációval lerövidítheti az ilyen kísérletekhez szükséges időt (lásd: 2.2.3. fejezet).

Ugyanakkor az afrikai harcsa esetében határozott különbség van a két ivar növekedési rátájában is (Henken és mtsai., 1987), ami kihasználható genommanipulációval és ivarátfordítással előállított YY kromoszómás szuperhímek előállításával (ezek utódai mind XY hímek lesznek). Ennek során fontos szerepe lehet a korai ivarvizsgálatoknak, így a molekuláris markerek is fontosak lehetnek a halászati felhasználás számára is. Az alapkutatásban lehetővé válik az ivar fejlődés korai stádiumainak elkülönített vizsgálata is. A markerek kiinduló pontot jelenthetnek az ivar determinációban és az ivarszervek kialakulásában szerepet játszó, vagy más a két ivarban eltérően működő gének azonosításában, de segítséget nyújthat a különböző ivarok hormonális folyamatainak vizsgálatában is az egyedfejlődés során.

Az ivarspecifikus DNS markerekkel lehetőség nyílhat a már ismert ivart befolyásoló környezeti tényezők (hőmérséklet, pH) hatásának részletesebb vizsgálatára, de az újabban felfedezett ivarra ható kémiai hatások gyors vizsgálata is lehetséges a segítségükkel. Külön kiemelném a különböző herbicidek és más hormonhatású szennyező anyagok hatásának, környezeti telítettségének és kritikus határértékeinek vizsgálatát. Ezek az anyagok ugyanis már igen csekély dózisban is okozhatnak ivarfejlődési rendellenességet azoknál az élőlényeknél, amelyek az anya szervezetén kívül vizes környezetben fejlődnek. Erre a jelenségre a béka fajok pusztulása kapcsán figyeltek fel (Hayes, 2002), de a halak is a veszélyeztetett élőlények között szerepelnek. Az ilyen típusú szennyezések ivarfejlődésre gyakorolt hatásának mérésére lazacoknál ivarspecifikus markereken alapuló mérési

rendszert dolgoztak ki (Afonso és mtsai., 2002). Az afrikai harcsán kidolgozott tesztrendszerrel ez a faj is alkalmassá vált ilyen típusú vizsgálatok végzésére, akár olyan gyengébb minőségű, oxigénben szegényebb természetes vizekben is amelyek a lazacokkal végzett vizsgálata nem lehetséges.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Elvégzett vizsgálataim alapján a következő új tudományos eredményeket kaptam:

1) Összesen öt, a Clariidae családba tartozó harcsafajon és a compón (*Tinca tinca*) végzett ivarspecifikus összehasonlító RAPD vizsgálat során kimutattuk, hogy az OPO-01-es és az OPM-08-as primerek mintázata kapcsoltságot mutat a detektált fenotípusos ivarral, az afrikai harcsa egyedekben. A másik öt faj genomjából a vizsgált RAPD primerek nem amplifikáltak ivarspecifikus mintázatot.

2) Izoláltam és plazmid vektorba klónoztam az ivarspecifikusan előforduló fragmenteket és meghatároztam bázissorrendjüket. A CgaY1 marker pontos hossza 2584 bp-nak, míg a CgaY2-é 458 bp-nak adódott.

3) Southern hibridizáció felhasználásával bizonyítottam, hogy a CgaY1 marker a *C. gariepinus*-ban csak a hímek genomjában fordul elő (feltehetően több kópiában), míg az ikrások genomjából teljesen hiányzik. A CgaY2 marker a Southern hibridizációk során mind a hím-, mind a nőivarú genomban azonos hibridizációs mintázatot mutatott.

4) Az izolált fragmentekre specifikus primereket terveztem, és SCAR markerekké alakítottam őket. A SCAR primerek felhasználásával duplex, majd triplex PCR reakción alapuló teszteljárást dolgoztam ki az egyedek molekuláris ivarmeghatározására, amelyek a hím genomból kettő (egy ivarspecifikus és egy kontroll), illetve három (két ivarspecifikus és egy kontroll), míg az ikrások genomjából csak egy fragmentet sokszoroznak fel.

5) Az ivarspecifikus markerekkel végzett részletes vizsgálatok eredményeként megállapítható, hogy az afrikai harcsa genetikailag meghatározott ivarú, XX/XY ivari kromoszóma rendszerrel rendelkező faj.

6) Összesen öt családba tartozó tizenkét különböző harcsa faj vizsgálata során „zoo hibridizációval” megállapítottam, hogy mindkét marker csak a *Clariidae* családba tartozó fajok esetében mutat hibridizációs mintázatot. Megállapítottam hogy a CgaY2 viszonylag erős hibridizációt mutatott a vizsgált fajok (*Clarias gariepinus; Clarias macrocephalus; Heterobranchus longifilis*) mindkét ivarában és nem mutattak különbséget a két ivar között, míg a CgaY1 próbával végzett „zoo hibridizáció” alapján feltételezhető, hogy a marker homológja *Heterobranchus longifilis* és a *Clarias batrachus* fajokban ivarspecifikusan , míg a *C. fuscus* esetében ivartól függetlenül van jelen.

7) Egy tenyészpár random kiválasztott utódcsoportjának vizsgálta alapján megállapítottam, hogy a CgaY1 ivarspecifikus DNS markerrel végzett duplex molekuláris szexálási eljárás a gyakorlatban 96,6%-os biztonsággal alkalmazható a fenotípusos ivar előrejelzésére.

8) A CgaY1 marker *Clarias batrachus*-ban megtalálható homológjának izolálására tett kísérlet során 21 mikroszatellit típusú bázispár ismétlődést azonosítottam. Ezek közül 18 volt alkalmas arra, hogy specifikus primerpárok tervezésével mikroszatellit markerré alakítsuk őket. A markerek határoló régióira tervezett primerpárok – azok konzervált volta miatt - alkalmasak lehetnek nem csak az afrikai harcsa, hanem több más, a *Clariidae* családba tartozó harcsafaj genetikai analízisére is.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A halak a kialakuló ivar szempontjából nagyon összetett csoportot alkotnak. Megtalálható köztük a hermafroditizmus különböző formái éppúgy, mint a genetikailag meghatározott ivardetermináció és a környezet által befolyásolt ivarú fajok. A háttérben álló meghatározó génekről szinte egyáltalán nincsenek ismereteink és ivarspecifikus genetikai markerek is csak kevés faj esetében ismertek.

A dolgozatban szereplő kutatás célja olyan ivarhoz kötött DNS markerek azonosítása volt, amelyek segítséget nyújthatnak az ivar determináció és a korai ivar differenciálódás megértésében és lehetővé teszik olyan molekuláris teszteljárás kidolgozását, amely gyorsan és egyszerűen alkalmazható - akár már lárva korban - az ivarok elkülönítésére.

A vizsgálatok a harcsafélék *Clariidae* családjába tartozó fajokon, valamint a pontyfélékhez tartozó compón (*Tinca tinca*) történtek a hím és női genom összehasonlító RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analízisével. E munka eredményeként két hím ivarhoz kötött DNS markert azonosítottunk az afrikai harcsa *Clarias gariepinus* genomjából, amelyeket izoláltam és részletesen jellemeztem. A szekvencia adatok alapján mindkét fragmentre specifikus (SCAR) primereket terveztem, amelyek ivarspecifikusságát egyedi fenotípusos és DNS vizsgálatokkal is igazoltam. Az eredmények a CgaY1 esetében tökéletes, míg a CgaY2-nél igen jó összhangot mutattak a fenotípusos ivarral.

A további analízis során a CgaY1 markerrel végzett Southern hibridizáció kizárólag a hím ivarban mutatott jeleket, míg az ikrásoknál nem volt megtalálható. Ugyanakkor a CgaY2 próba mindkét ivarban mutatott hibridizáló fragmenteket, annak ellenére, hogy a korábbi vizsgálatok során (RAPD és specifikus PCR) ez a marker csak a hím ivarban volt kimutatható.

Az elvégzett vizsgálatok azt bizonyítják, hogy az afrikai harcsa genetikailag jól meghatározott ivardeterminációval rendelkezik, amely az XX/XY ivari kromoszóma rendszert követi. Mindezt megerősítik azok a FISH kromoszóma hibridizációs vizsgálatok is, amelyeket együttműködőnk végzett el. Ennek során a CgaY1 marker csak egyetlen kromoszóma egyetlen pontjával hibridizált a hímivarban, míg a CgaY2 próba nem adott hibridizációs jelet sem a hím, sem pedig a női kariotípus egyik kromoszómájára sem.

A SCAR primerek és egy belső kontrollként használt, minden egyedben megtalálható fragment felhasználásával „duplex és triplex PCR" reakciókat alakítottam ki amelyek alkalmasak az egyedek ivarának molekuláris meghatározására, akár közvetlenül a megtermékenyítést követően. A kidolgozott tesztrendszerek gyakorlati alkalmazhatóságát is teszteltem, egy tenyészpár random kiválasztott utódcsoportjának vizsgálata során,. a duplex reakció felhasználásával, amely 96,6%-os biztonsággal volt alkalmazható a fenotípusos ivar előrejelezésére. A markerteszt eredményétől eltérő gonád fenotípust mutató egyedeket ismételt vizsgálatnak vetettem alá, mely az esetek többségében igazolta az eltérést. Az eltérést okozhatták a CgaY1 marker és az ivardeterminálló faktor között lezajlott rekombinációs események, vagy esetleg valamely környezeti hatás okozta ivarátfordulás.

Megvizsgáltam a markerek taxonómiai elterjedését különböző harcsafajokban. Ennek során öt családba tartozó tizenkét különböző harcsafaj genomjában vizsgáltam a markerek homológjainak jelenlétét „zoo hibridizációval" a markereket alkalmazva próbaként. Mindkét marker csak a *Clariidae* családba tartozó fajok esetében mutatott hibridizációs jeleket. A CgaY1 próba, a *Heterobranchus longifilis* és a *Clarias batrachus* fajok genomjához ivarspecifikusan hibridizált, míg a *C. fuscus* esetében ivartól függetlenül volt jelen. A CgaY2 azonban minden vizsgált *Clariidae* fajban hibridizációt mutatott mindkét ivarban, amelyek mintázatában nem volt különbség a két ivar között.

Kísérletet tettem a *Clarias batrachus* genomjában megtalálható ivarspecifikus homológ izolálására. Ennek során, egy részleges genomi könyvtárból 21 mikroszatellit típusú szekvenciát azonosítottam, amelyek közül 18 volt alkalmas arra, hogy specifikus primerpárok tervezésével mikroszatellit markerré alakítsuk őket. Ezek működését együttműködőm rokon fajokban is vizsgálta, és többségük ezekben a fajokban is polimorfnak bizonyult. Így e konzervált, több rokon fajban is alkalmazható mikroszatellit markerek jelentősen megkönnyíthetik a Clariidae családba tartozó - és esetleg a velük távolabbi rokonságban álló - harcsafajok populációinak analízisét is.

A harcsafélékből ismereteink szerint a CgaY1 és CgaY2 voltak az első ivarspecifikus markerek, azóta azonban már törpeharcsából származó ivarhoz kapcsolt mikroszatellit markereket is leírtak. Emellett a CgaY1 lehet a második olyan halakból izolált DNS marker, amelynek homológja több fajban is ivarhoz kötött.

Az izolált markereknek fontos szerepe lehet a további kutatásokban, de a halászat gyakorlatában is hasznosítható. Alkalmazásuk lehetővé teheti a faj növekedési rátájában kimutatható ivari különbség kiaknázását, populációk ivararányának beállítását, andro-, gynogenezisek és hormonális kezelések eredményességének korai igazolását, vagy az ivarkialakulást befolyásoló környezeti és kémiai hatások gyors vizsgálatát.

8. SUMMARY

Teleosts, as a class, are very complex in respect to their sex determination and gonad differentiation. Most fish species are gonochorists, some are sequential or true hermaphrodites. In the majority of the species tested sex determination is based on genetic mechanisms, however there are a number of species, where environmental and even social effects can modify the genetically programmed sex. The literature on the genes involved with sexual differentiation is very limited and sex-specific DNA markers are have been described only in a few species.

The purpose of the research presented in my thesis was to identify sex-specific DNA markers. Such markers would contribute to our knowledge on sex determination and early sex differentiation. The use of these markers allowed for the development of a molecular test method, which would be applicable to fast and simple separation of the two sexes even during larval development.

The studies were performed by using comparative RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis on several catfish species of the *Clariidae* family and on the tench from the *Cyprinidae* family. As a result of these experiments two male-specific markers were identified and characterized from the genome of *Clarias gariepinus*. On the basis of the sequence data, specific primers (SCAR) were constructed for both fragments and their sex-specificity was verified by individual phenotypic and DNA analyses as well. According to the results, CgaY1 was completely specific to the sexual phenotype, whereas CgaY2 showed very good agreement with it.

During the detailed characterization the CgaY1 probe generated a signal in males at Southern hybridisation, but not in the females. On the other hand, the CgaY2 probe generated signals in the genome of both sexes, although the marker could only be detected in males by earlier analyses (RAPD and specific PCR).

These studies confirm that *Clarias gariepinus* posesses genetic sex-determination, which follows the XX/XY sex chromosomal system. This is further supported by the results of FISH chromosome hybridisation analysis performed by my collaborator. In these analyses the CgaY1 probe hybridised to one locus of one chromosome solely in males, whereas CgaY2 failed to hybridize to any chromosmes of either of the two genomes.

Duplex and triplex PCR reactions were set up using SCAR primers and a universal fragment present in each individual as positiv control. These PCR reactions are applicable for molecular sex determination even following fertilisation. Practical utilisation of this technique was also tested with the duplex reaction on the offspring of a randomly selected breeding pair. My data showed, that this method is applicable for forecasting the phenotypic sex with 96.6% efficiency in African catfish. Individuals with unexpected gonad type (i.e. ovary in those predicted as males on the basis of molecular sexing) were subjected to repeated analysis, which confirmed the deviations for most of them. Possible reasons for the deviations could either be recombination between the two sex chromosomes at the CgaY1 locus or sex reversal caused by environmental reasons.

I have studied the presence of possible homologs of these markers in various other catfish species. The genome of twelve catfish species from five different families were tested by „zoo hybridisation" by using the markers as probes. The probes only hybridized to genomes of the clariid species. CgaY1 showed sex-specific hybridisation signals on the genome of *Heterobranchus longifilis* és a *Clarias batrachus*, but it sohwed the same pattern in both sexes of *C. fuscus*. CgaY2 hybridised to the genome of all clariid species tested, but produced indentical patterns on both sexes in each species.

Isolation of the male-specific CgaY1 homolog was attempted from a partial genomic library of *C. batrachus*. This experiment yielded 21 microsatellite repeats, 18 of which were suitable for designing PCR primers to the flanking regions. These markers were characterized by my collaborator and they turned out to be polymorphic not only in *C. batrachus,* but in all clariid species tested. Therefore, these conserved microsatellites could be applied for the genetic analysis of the populations of these species.

According to our knowledge, CgaY1 and CgaY2 were the first two sex-specific DNA markers isolated from catfish, although some sex-related microsatellite markers have been also described from another species since then. Moreover, CgaY1 might be the second such fish-derived DNA marker, the homolog of which might be present in several species. Therefore, it might have important role in future research and aquaculture as well.

The practical benefits of these markers are that they allow us to take advantage from the growth rate difference between the sexes, to determine sex ratio in a population, to verify andro- and gynogenesis at early stage, as well as to use successful hormone treatment or to provide a rapid test for environmental and chemical effects on sexual development.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Afonso L.O., Smith J.L., Ikonomou M.G., Devlin R.H. (2002): Y-chromosomal DNA markers for discrimination of chemical substance and effluent effects on sexual differentiation in salmon. *Environ Health Pers.*, 110 (9) 881-887.

Agnese J.F., Oberdorff T., Ozouf-Costaz C., (1990): Karyotypic study of some species of family mochokidae pisces siluriformes evidence of female heterogamety. *J. Fish Biol.*, 37, 375-382.

Allen. P.J., Amos W., Pomeroy. P.P., Twiss S.D. (1995): Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. *Mol.Ecol.,*4 (6) 653-62.

Allendorf F.W., Gellman W.A., Thorgaard G.H. (1994): Sex-linkage of two enzyme loci in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout). *Heredity,* 72, 498-507.

Almeida-Toledo L.F., Foresti F. (2001): Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica*, 111 (1-3) 91-100.

Almeida-Toledo L.F., Daniel-Silva M.F.Z., Lopes C.E., Toledo-Filho S.A., (2000): Sex chromosome evolution in fish: II. second occurrence of an X1X2Y sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chrom. Res.*, 8: 335-340.

Anderson M. E., Leslie R. W. (2001): Review of the deep-sea anglerfishes (*Lophiiformes: Ceratioidei*) of Southern Africa. *Ichthyol. Bull. J.L.B. Smith Institute of Ichthyology,* 70, 32.

Andreata A.A., Doalmeidatoledo L.F., Oliveira C., Toledo S.D. (1993): Chromosome studies in Hypoptopomatinae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). II. ZZ/ZW sex-chromosome system, B chromosomes, and constitutive heterochromatin differentiation in Microlepidogaster leucofrenatus. *Cytogen.Cell Genet.*, 63, 215-220.

Aparicio S. (2000): Vertebrate evolution: recent perspectives from fish. *Trends Genet.*,16 (2) 54-6.

Apostol B.L., Black W.C. 4th, Reiter. P., Miller B.R. Related (1996): Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of Aedes aegypti in Puerto Rico. *Heredity*, 76 (4) 325-34.

Arango N.A., Lovell-Badge R., Behringer R.R. (1999): Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*, 99 (4) 409-19.

Arit D, Bensch S, Hansson B, Hasselquist D, Westerdahl H. (2004) Observation of a ZZW female in a natural population: implications for avian sex determination. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*,271: 249-251.

Badura L.L., Friedman H. (1988): Sex reversal in female betta-splendens as a function of testosterone manipulation and social-influence. *J. Comp. Psychol.*, 102, 262-268.

Balarin J.D. (1979): Tilapia - a guide to their biology and culture in Africa. University of Stirling, Stirling, UK, 1-218.

Baltzer F.,(1912): Ueber die Entwicklungsgeschichte von Bonellia. *Verh.dt.zool.Ges*., 22, 252-261.

Baratti M., Alberti A., Groenen M., Veeneddal T., Fugheri F. D. (2001): Polymorphic microsatellites developed by cross-species amplifications in common pheasant breeds. *Anim. Genet.*, 32, 222-225.

Bardakci F., Skibinski D.O.F. (1994): Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, 73, 117-123.

Baroiller J.F., Chourrout D., Fostier A., Jalabert B. (1995): Temperature and Sex-Chromosomes Govern Sex-Ratios of the Mouthbrooding Cichlid Fish Oreochromis-Niloticus. *J. Exp. Zool.*, 273, 216-223.

Bártfai R., Egedi S., Yue G. H., Kovács B., Urbányi B., Tamás G., Horváth L. and Orbán L. (2003): Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, 219 (1-4) 157-167.

Bekkevold D., Hansen M.M., Loeschcke V. (2002): Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (*Gadus morhua, L.*). *Mol. Ecol.*, 11 (1) 91-102.

Bello N., Sanchez A. (1999): The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Mol. Ecol.*, 8, 667-669.

Benson, G.: (1999): “Tandem Repeats Finder: a program to analyze DNA sequences”. *Nucleic Acids Res.*, 27 (2) 573-580.

Benter T., Papadopoulos S., Pape M., Manns M., Poliwoda H. (1995): Optimization and reproducibility of random amplified polymorphic DNA in human. *Ana.l Biochem.*, 230 (1) 92-10.

Bercsenyi M., Magyary I., Urbanyi B., Orban L., Horvath L. (1998): Hatching out goldfish from common carp eggs: interspecific androgenesis between two cyprinid species. *Genome*, 41, 573-579.

Bertollo L.A.C., Fontes M.S., Fenocchio A.S., Cano J. (1997): The X1X2Y sex chromosome system in the fish Hoplias malabaricus .1. G-, C- and chromosome replication banding. *Chromosome Res.*, 5, 493-499.

Bertollo L.A.C., Mestriner C.A. (1998): The X1X2Y sex chromosome system in the fish Hoplias malabaricus. II. Meiotic analyses. *Chromosome Res.*, 6, 141-147.

Bertollo L.A.C., Takahashi C.S., Moreira-Filho O. (1983): Multiple sex chromosomes in the genus *Hoplias* (Pisces, Erythrinidae). *Cytologia*, 48, 1-12.

Bianchi A.P. and Meliado. P. (1998): Analysis of the karyotypes of four species of the Leptynia attenuata complex (Insecta Phasmatodea) *Caryologia,* 51 (3-4): 207-219.

Bieniarz K., Koldras M., Mejza T. (1997): Unisex and polyploid populations of cyprinid and silurid fish. *Arch. Ryb. Pol./Arch. Pol. Fish.*, 5, 31- 36.

Borowsky R., Wilkens H. (2002): Mapping a cave fish genome: polygenic systems and regressive evolution. *J Hered.*, 93 (1) 19-21.

Bridges C.B. (1925): Sex in relation to chromosomes and genes. *Am.Nat.*, 59, 127-137.

Brusle´ Sicard S., Fourcault B. (1997): Recognition of sex-inverting protandric Sparus aurata: ultrastructural aspects. *J. Fish Biol.*, 50, 1094-1103.

Bull J.J. (1980): Sex determination in reptiles. *Q. Rev. Biol.*, 55 (1) 3-21.

Bull J.J., Hillis D.M., O'Steen S. (1988): Mammalian ZFY sequences exist in reptiles regardless of sex-determining mechanism. *Science*, 242, 567-569.

Charlesworth B.(1991): The evolution of sex chromosomes. *Science*, 251, 1030-1033.

Charlesworth B.(1996): The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol.,* 6 (2) 149-162.

Charnov E.L. (1979): Natural Selection and Sex Change in Pandalid Shrimp: Test of a Life - History Theory. *Am. Nat.*, 113 (5) 715-734.

Charnov EL, Bull JJ (1977) When is sex environmentally determined? *Nature*, 266, 828-830

Chen H., Leibenguth F. (1995): Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*). *Biochem. Genet*., 33, 297-306.

Chen H.M., Rossier C., Morris M.A., Scott H.S., Gos A., Bairoch A., Antonarakis S.E. (1999): A testis-specific gene, TPTE, encodes a putative transmembrane tyrosine phosphatase and maps to the pericentromeric region of human chromosomes 21 and 13, and to chromosomes 15, 22, and Y. *Hum. Genet.*, 105, 399-409.

Chiang E.F-L., Pai C.H., Chung B. (1998): Expression of zebrafish SOX9 homologous in cartilage and gonad implies functional conservation in fish and mammals. *CSH Zebrafish development and genetics meeting Abstract book*, 195.

Chiang E.F.L., Pai C.I., Wyatt M., Yan Y.L., Postlethwait J., Chung B.C. (2001): Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: Expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev. Biol.,* 231 (1): 149-163.

Choudhury R.C., Prasad R., Charan Das C. (1982): Karyological studies in five tetraodontiform fishes from the Indian Ocean. *Copeia,* 1982, 728-732.

Coe W.R. (1936):Sexual Phases in Crepidula. *J.Exp. Zool*., 72: 455-477.

Conover D.O. and Heins S.W. (1987): Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. *Nature,* 326, 496- 498.

Conover D.O., Kynard B.E. (1981): Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science*, 213, 577-579.

Conover D.O. and Fleisher M. (1986). The temperature-sensitive period of sex determination in *Menidia menidia*. *Can. J. Fish. Aq. Sci*. 43(3): 514-520.

Cook J. M., Crozier R. H. (1995): Sex determination and population biology in the Hymenoptera. *Trends Ecol. Evol.,* 10, 281-286.

Corley-Smith G.E., Lim C.J.,Brandhorst B.P. (1996): Production of androgenetic zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics,* 142, 1265-1276.

Coughlan T., Schartl M., Hornung U., Hope I., Stewart A. (1999): PCR-based sex test for Xiphophorus maculatus. *J. Fish Biol.,* 54, 218-222.

Craig J.K., Foote C.J., Wood C.C., (1996): Evidence for temperature-dependent sex determination in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53, 141-147.

Cutter M.A.G, Drexler E., McCullough L.B., McInerney J. D., Murray J. C., Rossiter B., Zola J. (1992): The Science and Technologly of the Human Genome Project. In Mapping and Sequenciq The Human Genome:Science, Ethics, and Pablic Policy. BSCS and the American Medical Association eds.(Colorado Springs, Colorado, U.S.A.);1-14. p.

Davis K.B., Simco B.A., Goudie C.A., Parker N.C., Cauldwell W., Snellgrove R. (1990): Hormonal Sex Manipulation and Evidence For Female Homogamety in Channel Catfish. *Gen.Comp.Endocr.,* 78, 218-223.

Devlin R. H., Nagahama Y. (2002): Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, (3-4), 191-364.

Devlin R.H., McNeil B.K., Groves T.D.D., Donaldson E.M. (1991): Isolation of a Y-Chromosomal Dna Probe Capable of Determining Genetic sex in chinook salmon (*Oncorhynchus tsawytscha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48, 1606-1612.

Devlin R.H., McNeil B.K., Solar I.I., Donaldson E.M. (1994): A rapid PCR-based test for Y-chromosomal DNA allows simple production of all-female strains of chinook salmon. *Aquaculture*, 128, 211-220.

Dinesh K.R., Lim T.M., Chan W.K. and Phang V.P.E. (1996): Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. *Aquacult. Intern*., 4, 19-30.

Dinesh K.R., Lim T.M., Chua K.L., Chan W.K. and Phang V.P.E. (1993): RAPD analysis: An efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zool. Sci.*, 10, 849-854.

Du S.J., Devlin R.H., Hew C.L. (1993): Genomic structure of growth hormone genes in chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha): presence of two functional genes, GH-I and GH-II, and a male-specific pseudogene, GH-U. *DNA Cell Biol.,* 12, 739-751.

Dubinyin N.P. (1977): Általános genetika, Ivargenetika, Tankönyvkiadó Budapest, 487-503.

Eck G.W. and Allen J.D. (1993): The effects of temperature on sex determination in the bloater Coregonus hoyi: a hypothesis test. *Proc. Fifth Internat. Sympo. Adv. Limnol,* 46, 173-179.

Elinson R. P. (1983): Inheritance and expression of a sexlinked enzyme in the frog, *Rana clamitans*. *Biochem. Genet*., 21, 435-442.

Ellegren H. (2000): Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends Ecol. Evol*., 15 (5) 188-192.

Ellegren H. (2001): Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W? *EMBO Rep*., 2 (3) 192-6.

Ellegren H. (2002): Dosage compensation: do birds do it as well? *Trends Genet.* 18 (1) 25-8.

Ellegren H. and Carmichael A. (2001): Multiple and independent cessation of recombination between avian sex chromosomes. *Genetics*, 158(1):325-31.

Ferguson M.W. J. and Joanen T. 1982. Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. *Nature,* 296, 850-853.

Fésüs L.: A direkt géntesztek és a markervizsgálatok gyakorlati alkalmazása. Fejezet a Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben című könyvben (Szerk.: Fésüs L., Komlósi I., Varga L., Zsolnai A). (AGRIMFORM Kiadó és Nyomda Kft. Budapest, 2000):. 142-173.

Foo C.L., Dinesh K.R., Lim T.M., Chan W.K. and Phang V.P.E. (1995): Inheritance of RAPD markers in the guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Zool. Sci*. 12, 535-541.

Forbes S.H., Knudsen K.L., North T.W., Allendorf F.W. (1994): One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proc. Nalt. Acad. Sci. U S A.,* 91, 1628-1631.

Fredga K., Gropp A., Winking H. and Frank F. (1976): Fertile XX- and XY-type females in the wood lemming Myopus schisticolor. *Nature,* 261, 225-227.

Fridolfsson A.K., Cheng H., Copeland N.G., Jenkins N.A., Liu H.C., Raudsepp T., Woodage T., Chowdhary B., Halverson J., Ellegren H. (1998): Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proc. Nalt. Acad. Sci. U S A.,*95 (14):8147-52.

Frolov S.V. (1990): Differentiation of sex chromosomes in salmonidae: III. Multiple sex chromosomes in Coregonus sardinella. *Tsitologiya* 32, 659- 663.

Fukada S., Tanaka M., Iwaya M., Nakajima M., Nagahama Y., (1995): The Sox gene family and its expression during embryogenesis in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Dev. Growth Differ*., 37, 379- 385.

Galbusera. p., Volckaert F.A.M., Ollevier F. (2000): Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation. *Aquaculture*, 185, 25-42.

Garcia D. K., Dhar A. K., and Alcivar-Warren A. (1996): Molecular analysis of a RAPD marker (B20) reveals two microsatellites and differential mRNA expression in *Penaeus vannamei*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 5, 71-83.

Gellmann W.A., Allendorf F.W. and Thorgaard G.H. (1987): Hexosaminidase is sex linked in rainbow trout. *Isozyme Bull.,* 20, 14.

Gilbert S.F. (2000): sex determination, in: Developmental biology, sixth edition Sinauer Associates, Inc. (Publishers Sunderland, Massachusetts). 523-545.

Godwin J. (1994 a.): Behavioural aspects of protandrous sex change in the anemonefish, *Amphiprion melanopus*, and endocrine correlates. *Anim. Behav*., 48, 551- 567.

Godwin J. (1994 b):. Histological aspects of protandrous sex change in the anemonefish *Amphiprion melanopus* (Pomacentridae, Teleostei). *J. Zool*., 232, 199- 213.

Golovinskaya K.A. (1968): Genetics and selection of fish and artificial gynogenesis of the carp (*Cyprinus carpio*). *FAO Fisheries Reports,* 44 (4) 215-222.

Gomot-de Vaufleury A. (2001) Regulation of growth and reproduction, in: Barker G. M.(Ed.) The biology of terrestrial mollusks, *(eCAB international)* 331-355.

Goodier J.L. and Davidson W.S. (1994): Tc1 Transposon-like Sequences are Widely Distributed in Salmonids, *J. Mol. Biol.*, 241 (1-4) 26-34.

Goodwin E.B. and Ellis R.E. (2002): Turning clustering loops: sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*., 12(3) 111-20.

Goudie C.A., Simco B.A., Davis K.B. (1995): Failure of gynogenetically-derived male channel catfish to produce all-male offspring. *Proc. Fifth Internat. Symp. Reproductive Physiology Of Fish, Fish Symposium 95, Austin, TX (USA),* 118.

Graves J.A. (1995): The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes-an evolving understanding. *Bioessays*, 17 (4) 311-20.

Graves J.A.M. (2000): Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis - A feminist view. *Biol Reprod.,* 63 (3) 667-676.

Graves J.A.M. (2003) Cytogenet sex and death in birds: a model of dosage compensation that predicts lethality of sex chromosome aneuploids. *Genome Res.* 101(3-4):278-282.

Griffiths R. and Orr K. (1999): The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. *Mol. Ecol.,* 8, 671-674.

Guan G., Kobayashi T., Nagahama Y., (2000): Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/ Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 272, 662-666.

Guerrero R.D. and Selton W.L.(1974): An Aceto-Carmine Squash Method for sexing Juvenile Fishes. *Prog. Fish Cult.* 36, 56.

Haffray. p., Vauchez C., Vandeputte M. and Linhart O. (1998): Different growth and processing traits in males and females of European catfish, *Silurus glanis*, *Aquat. Living Resour.*, 11 (5) 341-345.

Harry J.L., Briscoe D.A., Williams K.L. (1992): Putting the heat on sex determination. *Genetica*, 87 (1) 1-6.

Hattori A. (1991): Socially controlled growth and size-dependent sex change in the anemonefish Amphiprion frenatus in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Ichthyol*., 38, 165-178.

Heard E., Clerc P., Avner P. (1997): X-chromosome inactivation in mammals. *Annu. Rev. Genet.,* 31, 571-610.

Hayes T.B., Collins A., Lee M., Mendoza M., Noriega N., Stuart A.A., Vonk A. (2002): Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*., 16;99 (8) 5476-80.

Hearne C. M., Ghosh S., Todd J. A. (1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.*, 8:288-293.

Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt. p.H. (1997): Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques,* 23, 504-511.

Henken A.M., Brunink A.M., Richter C.J.J. (1987): Differences in growth rate and feed utilization between diploid and triploid African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture,* 63, 1-14.

Hille A., Janssen I.A., Menken S.B., Schlegel M., Thorpe R.S. (2002): Heterologous amplification of microsatellite markers from colubroid snakes in European natricines (*serpentes: natricinae*). *J. Hered*., 93 (1) 63-6.

Holloway A. K., Strand M. R., Black W. C. and Antolin M. .F. (2000): Linkage analysis of sex determination in *Bracon sp near hebetor* (Hymenoptera : Braconidae). *Genetics,* 154 (1) 205-212.

Horváth L., Tamás G. and Tölg I. (1984): Propagation of common carp. In: Special methods in fish husbandry. (Editor: Halver, J.E.) Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary1-54.

Horváth, L. and L. Orbán (1995): Genome and gene manipulation in common carp. *Aquaculture,* 129, 157-181.

Huisman E.A., Richter C.J.J. (1987): Reproduction, growth, health control and aquaculture potential of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1982). *Aquaculture* 185, 25-42.

Hunt G.J., Page R.E. Jr. (1994): Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera)*. *Mol. Gen. Genet*., 1;244 (5) 512-8.

Hurst L.D., Randerson J.P. (1999): An eXceptional chromosome. *Trends. Genet*., 15 (10) 383-385.

Husebye H., Lund S., Moeller M., Sunde A., Krokan H.E. (1994): A Bkm-related DNA sequence gives individual DNA fingerprints in turbot (*Scophthalmus maximus*), but neither Bkm-related, human SRY or human ZFY probes detect genetic sex differences. *Comp. Biochem. Physiol. B.,* 107B, 69- 73.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature,* 409; 860-921.

Isoda K., Shiraishi S., Watanabe S., Kitamura K. (2000): Molecular evidence of natural hybridization between *abies veitchii* and *A. homolepis*

(Pinaceae) revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. *Mol Ecol*., 9 (12) 1965-74.

Iturra. P., Medrano J.F., Bagley M., Lam N., Vergara N., Marin J.C. (1997): Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. *Genetica,* 101, 209-213.

Joachim A., Tenter A. M., Jeffries A. C. and Johnson A. M. (1996): A RAPD-PCR derived marker can differentiate between pathogenic and non-pathogenic Sarcocystis species of sheep. *Mol. Cell. Probe.*, 10 (3) 165-172.

Kallman K.D. (1984): A new look at sex determination in poeciliid fishes. *Evol. Genet. Fishes*, 95-171.

Kallman K.D. and Bao I.Y. (1987): Female heterogamety in the swordtail, *Xiphophorus alvarezi Rosen* (Pisces, Poeciliidae), with comments on a natural polymorphism affecting sword coloration. *J. Exp. Zool*., 243 (1) 93-102.

Kallmann K. (1973): The sex-determining mechanism of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. in Genetics and mutagenesis in fish. (Ed. Schröder, J.H.) (Springer, New York): 19-28.

Kaneko .Y, Takano S., Okumura K., Takenawa J., Higashituji H., Fukumoto M., Nakayama H., Fujita. J. (1993): Identification of protein tyrosine phosphatases expressed in murine male germ cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 197, 625-631.

Kantanen J., Vilkki J., Elo K., Maki-Tanila A. (1995): Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: application for detecting genetic variation. *Anim. Genet*., 26 (5) 315-20.

Kashi Y., King D., Soller M. (1997): Simple Sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends. Genet*., 13 (2) 74-78.

Kawakami, K, Hopkins, N (1996) Rapid identification of transgenic zebrafish. *Trends. Genet.,* 12, 9-10.

Kent J., Wheatley S.C., Andrews J.E., Sinclair A.H., Koopman. P. (1996): A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.*, 122 (9) 2813-22.

Kime D.E., (1995): The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish*., 5, 52- 96.

King T.L, Kalinowski S.T., Schill W.B., Spidle A.P., Lubinski B.A. (2001): Population structure of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a range-wide perspective from microsatellite DNA variation. *Mol. Ecol.*;10 (4) 807-21.

Koehler M.R., Neuhaus D., Engel W., Schartl M. and Schmid M. (1995): Evidence for an unusual ZW/ZW'/ZZ sex-chromosome system in *Scardinius erythrophthalmus* (Pisces, Cyprinidae), as detected by cytogenetic and H-Y antigen analyses. *Cytogenet. Cell Genet.,* 71, 356-362.

Kondo M., Nanda I., Hornung U., Asakawa S., Shimizu N., Mitani H., Schmid M., Shima A. and Schartl M. (2003): Absence of the Candidate Male Sex-Determining Gene dmrt1b(Y) of Medaka from Other Fish Species. *Curr. Biol.,* 13 (5) 416-420.

Koopman. p., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow. P., Lovell-Badge R. (1991): Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*., 351(6322) 117-21.

Kovács, B., Egedi, S., Bártfai R., and Orbán L. (2001) Male-specific DNA markers from African catfish (Clarias gariepinus). Molecular sexing of African catfish by novel male-specific DNA markers. *Genetica.,* 110: 267-276.

Lahn B.T. and Page D.C. (1997): Functional coherence of the human Y chromosome. *Science,* 278 (5338) 675-680.

Lahn B.T. and Page D.C. (1999): Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science,* 286 (5441) 964-967.

Lahn B.T. and Page D.C. (2000): A human sex-chromosomal gene family expressed in male germ cells and encoding variably charged proteins. *Hum. Mol. Genet.,* 9 (2) 311-319.

Le Grande W.H. (1981): Chromosomal evolution in North American catfish (Siluriformes, Ictaluridae) with particular emphasis on the madtoms, Noturus. *Copeia,* 1981, 33-52.

Lee B.Y., Hulata G., Kocher T.D. (2004) Two unlinked loci controlling the sex of blue tilapia (*Oreochromis aureus*). *Heredity*,92(6):543-549.

Lessells C.M., Mateman A.C. (1998): Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Ecol*., 7 (2) 187-195.

Li Y., Hill J.A., Yue G.H., Chen F. and Orban L. (2002): Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetraodon nigroviridis*. *J. Fish. Biol*., 61 (5) 1314-1317.

Lima M.M. and Seuanez H.N. (1991): Chromosome studies in the red howler monkey, *Alouatta seniculus stramineus* (Platyrrhini, Primates): description of an X1X2Y1Y2/X1X1X2X2 sex-chromosome system and karyological comparisons with other subspecies. *Cytogenet. Cell Genet.*, 57 (2-3) 151-6.

Lin W.W., Wang H.W., Sum C., Liu D., Hew. C.L., Chung B.C. (2000): Zebrafish ftz-f1 gene has two promoters, is alternatively spliced, and is expressed in digestive organs. *Biochem. J.,* 348, 439-446.

Liu D., Chandy M., Lee S.K., Le Drean Y., Ando H., Xiong F., Lee J.W., Hew C.L. (2000): A zebrafish Ftz-F1 (Fushi Tarazu Factor 1) homologue requires multiple subdomains in the D and E regions for its transcriptional activity. *J. Biol. Chem.,* 275, 16758-16766.

Liu Q., Goudie C.A., Simco B.A., Davis K.B. (1996a): Sex-linkage of glucose phosphate isomerase-B and mapping of the sex-determining gene in channel catfish. *Cytogenet. Cell Genet*., 73, 282- 285.

Liu S.J. and Yao Z.Z. (1995): Self-fertilization of hermaphrodites of the teleost *Clarias lazerea* after oral administration of 17-alpha-methyltestosterone and their offspring. *J. Exp. Zool.*, 273, 527-532.

Liu S.J., Yao Z.Z., Wang Y.Q. (1996b): Sex hormone induction of sex reversal in the teleost *Clarias lazera* and evidence for female homogamety and male heterogamety. *J. Exp. Zool.,* 276, 432-438.

Lloyd M.A., Fields M.J. and Thorgaard G.H. (1989): Bkm minisatellite sequences are not sex associated but reveal DNA fingerprint polymorphism in rainbow trout. *Genome,* 32, 865-868.

Lyon M. (1961): Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus*). *Nature,* 190, 372-373.

Madl, J.E., and Herman, R.K.(1979) Polyploids and sex determination in Caenorhabditis elegans. *Genetics,* 93, 393-402.

Mandolino G., Carboni A., Forapani S., Faeti V., Ranalli. P. (1999): Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.,* 98, 86-92.

Manning N.J. and Kime D.E. (1984): Temperature regulation of ovarian steroid production in the common carp, *Cyprinus carpio* L., in vivo and in vitro. *Gen. Comp. Endocrinol*., 56, 376-388.

Marchand O., Govoroun M., D'Cotta H., McMeel O., Lareyre J.-J., Bernot A., Laudet V., Guiguen Y. (2000): DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim. Biophys. Acta,* 1493, 180- 187.

Markert C.L. and Moller F. (1959): Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.*, 45, 753-763.

Martinez E.A., Destombe C., Quillet M.C., Valero M. (1999): Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers highly linked to sex determination in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Mol. Ecol.*, 8, 1533-1538.

Matsuda M., Kusama T., Oshiro T., Kurihara Y., Hamaguchi S., Sakaizumi M. (1997): Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. *Genes Genet. Syst.,* 72, 263-268.

Matsuda M., Matsuda C., Hamaguchi S., Sakaizumi M. (1998): Identification of the sex chromosomes of the medaka*, Oryzias latipes*, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.,* 82, 257-262.

Matsuda M., Nagahama Y., Shinomiya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., Morrey C.E., Shibata N., Asakawa S., Shimizu N., Hori H., Hamaguchi S., Sakaizumi M. (2002): DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417 (6888) 559-63.

Mauro L.J., Olmsted E.A., Skrobacz B.M., Mourey R.J., Davis A.R., Dixon J.E. (1994): Identification of a hormonally regulated protein tyrosine phosphatase associated with bone and testicular differentiation. *J. Biol. Chem.*, 269, 30659-30667.

May B., Johnson K.R., Wright E.J.J. (1989): Sex linkage in salmonids: evidence from a hybridized genome of Brook trout and Arctic charr. *Biochem. Genet.,* 27, 291-301.

McClean. p.E., Lee R.K., Otto C., Gepts. p., Bassett M.J. (2002): Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Hered*., 93 (2) 148-52.

McClung, C. E. (1902): The accessory chromosome—Sex determinant? *Biol. Bull.*, 3:43-84.

McConnell S.K., Beynon C., Leamon J., Skibinski D.O. (2000): Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (*Cichlidae*): extensive linkage group segment homologies revealed. *Anim Genet*., 31 (3) 214-8.

McElreavey K., Vilain E., Cotinot C., Payen E., Fellous M. (1993): Control of sex determination in animals. *Eur. J. Biochem*., 218 (3) 769-83.

McGowan C. and Davidson W.S. (1998): The RAPD technique fails to detect a male-specific genetic marker in Atlantic salmon. *J. Fish Biol.,* 53, 1134-1136.

Meyer A. and Schartl M. (1999) Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions.*Curr. Opin. Cell Biol.,* 11(6) 699-704.

Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 88, 9828-32.

Moran. p., Martinez J.L., GarciaVazquez E., Pendas A.M.(1996): Sex chromosome linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet. Cell Genet.,* 75, 145-150.

Moreira-Filho O., Bertollo L.A.C., Galetti. p.M. Jr., (1980): Evidences for multiple sex chromosome system with female heterogamety in *Appareiodon affinis* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia,* 33, 83-91.

Morgan T. H. (1910): Sex-limited inheritance in Drosophila. *Science,* 32: 120-122.

Mullis K.B. and Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol*., 155, 335-350.

Nakao S., Matsunaga S., Sakai A., Kuroiwa T., Kawano S.(2002): RAPD isolation of a Y chromosome specific ORF in a dioecious plant, *Silene latifolia*. *Genome*., 45 (2) 413-20.

Nakayama I., Biagi C.A., Koide N., Devlin R.H. (1999): Identification of a sex-linked GH pseudogene in one of two species of Japanese salmon (*Oncorhynchus masou* and *O-rhodurus*). *Aquaculture*, 173, 65-72.

Nakayama I., Foresti F., Tewari R., Scahrtl M. and Chourrout D. (1994): sex chromosome polymrophism and heterogametic males revealed by two

cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma*, 103, 31-39.

Nanda I., Zend-Ajusch E., Shan Z., Grutzner F., Schartl M., Burt D.W., Koehler M., Fowler V.M., Goodwin G., Schneider W.J., Mizuno S., Dechant G., Haaf T., Schmid M. (2000): Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet. Cell Genet.*., 89 (1-2) 67-78.

Nonaka M. (2001): Evolution of the complement system. *Curr. Opin. Immunol*., 13 (1) 69-73.

Ohsugi M., Kuramochi S., Matsuda S., Yamamoto T. (1997): Molecular cloning and characterization of a novel cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase that is specifically expressed in spermatocytes. *J. Biol. Chem.,* 272, 33092-33099.

Oliver A.S. (1997): Size and density dependent mating tactics in the simultaneously hermaphroditic seabass *Serranus subligarius* (Cope, 1870). *Behaviour,* 134, 563- 594.

O'Neill M., Binder M., Smith C., Andrews J., Reed K., Smith M., Millar C., Lambert D., Sinclair A. (2000): ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev. Genes Evol*., 210 (5) 243-9.

Orbán L. (2000): Molekuláris eljárások alkalmazása a haltenyésztésben. Fejezet a Halbiológia és haltenyésztés című könyvben (Szerk. Horváth L.) *Mezőgazda Kiadó, Budap*est 142-167.

Orzak S., Sohn J.J., Kallman K.D., Levin S.A., Johnston R. (1980): Maintenance of the Three sex chromosome polymorphism in the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Evolution,* 34, 663-672.

Ota K., Kobayashi T., Ueno K., Gojobori T. (2000): Evolution of heteromorphic sex chromosomes in the order Aulopiformes. *Gene,* 259, 25- 30.

Ozouf-Costaz C., Teugels G.G., Legendre M. (1990): Karyological analysis of three strains of the African Catfish, *Clarias gariepinus* (Clariidae), used in aquaculture. *Aquaculture,* 87, 271-277.

Pandey N., Lakra W.S. (1997): Evidence of female heterogamety, B-chromosome and natural tetraploidy in the Asian catfish, *Clarias batrachus*, used in aquaculture. *Aquaculture,* 149, 31-37.

Pandian T.J. and Koteeswaran R. (1998): Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiology,* 384, 167-243.

Pandian T.J., Koteeswaran R. (1998): Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 384, 167-243.

Panzera F., PÈrez R., Hornos S., Panzera Y., Cestau R., Delgado V., Nicolini. P. (1996): Chromosome Numbers in the Triatominae (*Hemiptera-Reduviidae*) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 91(4): 515-518. p

Parkhurst S.M., Meneely. p.M. (1994): Sex determination and dosage compensation: lessons from flies and worms. *Science*, 264 (5161) 924-32.

Pathak S., Lin C.C. (1981): Synaptonemal complex of the sex-autosome trivalent in a male indian muntjac. *Chromosoma,* 82 (3) 367-76.

Patino R., Davis K.B., Schoore J.E., Uguz C., Strussmann C.A., Parker N.C., Simco B.A., Goudie C.A. (1996): Sex differentiation of channel catfish gonads: Normal development and effects of temperature. *J. Exp. Zoo.,* 276, 209-218.

Peichel C.L., Ross J.A., Matson C.K., Dickson M., Grimwood J., Schmutz J., Myers R.M., Mori S., Schluter D., Kingsley D.M. (2004) The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Curr Biol.,* 14:1416-1424.

Phillips R.B. and Reed K.M. (1996): Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics. *Aquaculture,* 140 (3) 197-216.

Pieau C., Girondot N., Richard-Mercier G., Dasvages M., Dorizzi. P. and Zaborski. P. (1994): Temperature sensitivity of sexual differenciacion of gonads in the European pond turtle. *J. Exp. Zoo.,* 270, 86-93.

Piferrer F., Donaldson E.M. (1989): Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch,* after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture,* 77, 2- 3.

Postlethwaith J.H., Johnson S.L., Midson C.N., Talbot W.S., Gates M., Ballinger E.W., Africa D., Andrews R., Carl T., Eisen J.S., Horne S., Kimmel C.B., Hutchinson M., Johnson M., and Rodriguez A. (1994): A genetic linkage map for the zebrafish. *Science,* 264, 699-703.

Poulter R., Butler M., Ormandy J. (1999): A LINE element from the pufferfish (fugu) *Fugu rubripes* which shows similarity to the CR1 family of non-LTR retrotransposons. *Gene,* 227, 169-179.

Price D.J. (1984): Genetics of sex determination in fishes - A brief review. in Fish Reproduction: Strategies and tactics (Eds. G:G: Potts and R.J. Wooton) Academic Press, London, UK. 77-89.

Quintana-Murci L., Jamain S., Fellous M. (2001a):The origin and evolution of mammalian sex chromosomes. *C. R. Acad. Sc.i III.*, 324 (1) 1-11.

Quintana-Murci L., Krausz C., McElreavey K. (2001b): The human Y chromosome: function, evolution and disease *Forensic Sci. Int.,* 118 (2-3): 169-181.

Raymond C.S., Shamu C.E., Shen M.M., Seifert K.J., Hirsch B., Hodgkin J., Zarkower D. (1998): Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature,* 391, 691- 695.

Reamon-Buttner S.M., Schondelmaier J., Jung C. (1998): AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. *Mol. Breeding,* 4, 91-98.

Reed K.J., Sinclair A.H. (2002): FET-1: a novel W-linked, female specific gene up-regulated in the embryonic chicken ovary.*Gene Expr Patterns*. 2(1-2):83-6.

Reinboth. R., Brusle´ Sicard. S. (1997): Histological and ultrastructural studies on the effects of hCG on sex inversion in the protogynous teleost *Coris julis*. *J. Fish Biol*., 51, 738- 749.

Rhen T. and Lang J.W. (1999):Temperature during embryonic and juvenile development influences growth in hatchling snapping turtles, *Chelydra serpentina*, *J. Therm. Biol.,* 24, 33-41.

Rhind N.R., Miller L.M., Kopczynski J.B., Meyer B.J. (1995): xol-1 acts as an early switch in the *C. elegans* male/hermaphrodite decision. *Cell*; 80 (1) 71-82.

Richards C. M. and Nace G. W. (1978): Cytogenetic and hormonal sex reversal used in tests of the XX-XY hypothesis of sex determination in *Rana pipiens*. *Growth*, 42, 319-331.

Rishi, K.K. (1976): Karyotypic studies on four species of fish. *Nucleus* 19, 95- 98.

Rubin, D.A. (1985): Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). *Copeia,* 1985, 233- 235.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B.,. Horn G.T,. Ehrlich H.A and Arnheim N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science,* 230: 1350-1354.

Sakai Y. (1997): Alternative spawning tactics of female angelfish according to two different contexts of sexchange. *Behav. Ecol*., 8, 372- 377.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning (Cold Spring Harbor, NY, USA: CSH Laboratory Press),

Saxena O.P., Bhatia M.K. (1977): Intersexuality in the fresh water teleost, *Heteropneustes fossilis*. *Curr. Sci*., 46, 307.

Schartl M. (2004)A comparative view on sex determination in medaka. *Mech Dev*., 121 (7-8):639-645.

Schempp W., Wiberg U.H. and Fredga K. (1985): Correlation between sexual phenotype and X-chromosome inactivation pattern in the X*XY wood lemming. *Cytogenet. Cell Genet.,* 39, 30-34.

Schmid M., Nanda I., Steinlein C., Kausch K., Haaf T.and Epplen J.T. (1991): Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia in Amphibian Cytogenetics and Evolution. (eds. D.M. Green and S.K. Sessions) Academic Press, San Diego, USA. 393-430.

Schmid M., Nandra I., Guttenbach M., Steinlein C., Hoehn H., Schartl M., Haaf T., Weigend S., Fries R., Buerstedde J-M., Wimmers K., Burt D.W., Smith J., A'Hara S., Law A., Griffin D.K., Bumstead N., Kaufman J., Thomson. p.A., Burke T,. Groenen M.A.M, Crooijmans R.P.M.A., Vignal A., Fillon V., Morisson M., Pitel F., Tixier-Boichard M., Ladjali-Mohammedi K., Hillel J., Mäki-Tanila A., Cheng H.H., Delany M.E., Burnside J., and Mizuno S. (2000): First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet. Cell Genet.,* 90 (3-4) 169-218.

Seidel Jr. W. E. (2000): Reproductive Biotechnology and "Big" Biological Questions, *Theriogenology,* 53, Issue (1)187-194.

Shapiro D.Y. (1992): Plasticity of Gonadal Development and Protandry in Fishes. *J. Exp. Zool.,* 261, 194-203.

Shapiro D.Y. and Rasotto M.B., (1993): Sex differentiation and gonadal development in the diandric, protogynous wrasse, *Thalassoma bifasciatum* (Pisces, Labridae). *J. Zool.,* 230, 231- 245.

Sharma O.P. and Tripathi N.K. (1988): Female heterogamety in two Teleostean fishes. *Cytologia,* 53, 81-86.

Shepherd M., Cross M., Maguire L., Dieters J., Williams G., Henry J. (2002): Transpecific microsatellites for hard pines. *Theor Appl Genet*., 104 (5) 819-827.

Sinclair A.H., Berta. P., Palmer M.S., Hawkins J.R., Griffiths B.L., Smith M.J., Foster J.W., Frischauf A.M., Lovell-Badge R., Goodfellow. p.N. (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*., 346 (6281) 240-4.

Singh L., Purdom I.F., Jones K.W. (1979): Behaviour of sex chromosome associated satellite DNA in somatic and germ cells in snakes. *Chromosoma,* 71, 167-181.

Solari A.J., Fechheimer N.S., Bitgood J.J. (1988): Pairing of ZW gonosomes and the localized recombination nodule in two Z-autosome translocations in *Gallus domesticus*. *Cytogenet. Cell Genet.,* 48, 130-136.

St. Mary C.M. (1998): Characteristic gonad structure in the gobiid genus Lythrypnus with comparisons to other hermaphroditic gobies. *Copeia,* 1998, 720- 724.

Streit B., Stadler T., Schwenk K., Ender A., Kuhn K., Schierwater B. (1994): Natural hybridization in freshwater animals. Ecological implications and molecular approaches. *Naturwissenschaften*., 81 (2) 65-73.

Sumpter J.P. (1997): Environmental control of fish reproduction: a different perspective. *Fish Physiol. Biochem.,* 17, 25- 31.

Sunobe T., Nakazono A. (1993) Sex change in both directions by alteration of social dominance in Trimma okinawae Pisces Gobiidae. *Ethology,* 94, 339- 345.

Swain A. (2002): Vertebrate sex determination: a new player in the field. *Curr. Biol.* 3;12 (17) 602-3.

Tautz D.; Renz M. (1984): Simple Sequences are Ubiquitos Repetitive Components of Eukaryote Genomes. *Nucleic Asids Res.*, 12:4127-4138.

Teugels G.G. (1984): The nomenclature of African Clarias species used in aquaculture. *Aquaculture,* 38, 373-374.

Teugels G.G. (1996): Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (*Ostariophysi, Siluroidei*): an overview. *Aquat. Living Resour.,* 9, 9-34.

Teugels G.G., Ozouf-Costaz C., Legendre M., Parrent M. (1992): A karyological analysis of the artificial hybridisation between *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) and *Heterobranchus longifilis* Valenciennes, 1840 (*Pisces; Clariidae*). *J. Fish Biol*., 40, 81-86.

Tiersch T.R., Mitchell M.J., Wachtel S.S. (1991): Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Hum. Genet*., 87(5):571-3.

Tiersch T.R., Simco B.A., Davis K.B., Wachtel S.S (1992): Molecular genetics of sex determination in channel catfish: studies on SRY, ZFY, Bkm, and human telomeric repeats. *Biol. Reprod.,* 47 (2) 185-92.

Toder R., O'Neill R. J. W., Wienberg J., O'Brien. P. C. M., Voullaire L., Marshall-Graves J. A. (1997): Comparative chromosome painting between two marsupials: Origins of an XX/XY1Y2 sex chromosome system. *Mamm. Genome,* 8 (6) 418-422.

Tokuchi H., Higashitsuji H., Nishiyama H., Nonoguchi K., Nagao T., Xue J.H., Itoh K., Ogawa O., Fujita J. (1999): Expression of protein tyrosine phosphatase PTP-RL10 and its isoform in the mouse testis. *Int. J. Urol.*, 6, 572-577.

Traut W. and Marec F. (1997): Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Res.*, 5 (5) 283-91.

Traut W., Sahara K., Otto T. D., and Marec, F. (1999): Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma,* 108, 173-180.

Uguz C., Iscan M. and Togan I. (2003): Developmental genetics and physiology of sex differentiation in vertabrates. *Environ. Toxicol. Phar*., 14 (1-2): 9-16.

Underhill P.A., Shen P., Lin A.A., Jin L., Passarino G., Yang W.H., Kauffman E., Bonne-Tamir B., Bertranpetit J., Francalacci P., Ibrahim M., Jenkins T., Kidd J.R., Mehdi S.Q., Seielstad M.T., Wells R.S., Piazza A., Davis R.W., Feldman M.W. Cavalli-Sforza L.L., Oefner P.J. (2000):Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat. Genet.*, 26 (3) 358-61.

Urasaki N., Tokumoto M., Tarora K., Ban Y., Kayano T., Tanaka H., Oku H., Chinen I., Terauchi R. (2002): A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papayaL.*). *Theor. Appl. Genet*., 104 (2-3) 281-285.

Vaiman D. and Pailhoux E. (2000): Mammalian sex reversal and intersexuality: deciphering the sex-determination cascade. *Trends Genet.,* 16 (11) 488-94.

Varadi L., Benko I., Varga J., Horvath L. (1999): Induction of diploid gynogenesis using interspecific sperm and production of tetraploids in African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822). *Aquaculture,* 173, 401-411.

Varga L.: Genom térképezés. Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az álattenyésztésben (Szerk.: Fésüs L., Komlósi I.; Varga L.; Zsolnai A). (AGROINFORM, Budapest, 2000): 62-107.

Volobuev V. and Granjon L. (1996): A finding of the XX/XY_1Y_2 sex chromosome system in *Taterillus arenarius* (Gerbillinae, Rodentia) and its phylogenetic implications. *Cytogenet. Cell Genet*., 75, 45-48.

Waldbieser G.C., Bosworth B.G., Nonneman D.J., Wolters W.R. (2001): A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, Ictalurus punctatus. *Genetics,* 158 (2) 727-3.

Wallace H., Badawy G. M. I., Wallace B. M. N. (1999): Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell. Mol. Life. Sci*., 55 (6-7) 901-909.

Wang. p.J., McCarrey J.R., Yang F. and Page D.C. (2001): An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat. Genet.,* 27 (4) 422-426.

Welsh J., McClelland M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.,* 18, 7213-8.

Werner M.H., Huth J.R., Gronenborn A.M. and Clore G.M. (1996): Molecular determinants of mammalian sex. *Trends biochem. Sci..,* 21, 302-308.

Williams J.G., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1993b): Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.,* 218, 704-40.

Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.,* 18, 6531-5.

Williams J.G.K., Reiter R.S., Young R.M. and. Scolnik. p.A. (1993a): Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nucleic Acids Res.,* 21, 2697-2702.

Wittbrodt J., Meyer A.,. Schartl M. (1998): More genes in fish*? BioEssays,* 20 (6) 511-515.

Yamamoto T. (1955): Progeny of artificially induced sex reversals of male genotype (XY) in the medaka (*Oryzias latipes*) with special reference to YY-male. *Genetics,* 40, 406-419.

Yamamoto T. (1969): Sex differentiation. In Fish Physiology, W. S. Hoar and A. B. Randall, eds. (New York, NY, USA: Academic Press), 117-172.

Yoon J.M. and Kim G.W. (2001):Randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction analysis of two different populations of cultured Korean catfish *Silurus asotus*. *J. Biosci*., 26 (5) 641-7.

Yue, G.H., B. Kovacs and L. Orban. (2003): Microsatellites from Clarias batrachus and their polymorphism in seven additional catfish species. *Mol. Ecol. Notes*. 3: 465-468.

Zanaria E., Muscatelli F., Bardoni B., Strom T.M., Guioli S., Guo W., Lalli E., Moser C., Walker A.P., McCabe E.R.B., Meitinger T., Monaco A. P., Sassone-Corsi. P. and Camerino G. (1994): An unusual member of the nuclear hormone superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature,* 372, 635-641.

Zaparackaite I. and Barauskas V. (2003): Congenital genital anomalies. Aspects of diagnostics and treatment. *Medicina,* 39 (2) 105-13.

Zhang Y., Shan X.N., Liu N.S., Lu X.X., Nie W.H., Yang F.T., Wang J.H., Chen Y.Z. (2001): Localization of Sry gene on Y chromosome of Muntjac munticus vaginalis. *Prog. Nat. Sci.,* 11 (9) 706-709.

Zhang Y.H., Di Stilio V.S., Rehman F., Avery A., Mulcahy D., Kesseli R. (1998). Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus Silene. *Genome,* 41, 141-147.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, aki segítettek és támogattak munkám elvégzésében és dolgozatom elkészítésében.

Mindenek előtt Dr Orbán Lászlónak, témavezetőmnek, az egykori Hal Molekuláris Biológiai Laboratórium vezetőjének, aki minden nehézség és távolság ellenére mindvégig naprakészen követte, irányította és segítette munkámat és e dolgozat létrejöttét.

Dr Varga Lászlónak, jelenlegi csoportvezetőmnek azért az együttműködésért és gondoskodásért amellyel támogatta munkám befejezését.

Dr Horváth László professzor úrnak, a doktori iskola és a Halbiológia és Halgazdálkodás Alprogram vezetőjének, támogatásáért, segítőkészségéért, hasznos tanácsaiért, amellyel nyomon követte és irányította sorsomat.

Dr Urbányi Bélának azért a rengeteg baráti segítségért, és szervezésért amellyel mind a közös munkáink során, mind pedig a mindennapi életben segítette épülésemet.

Bártfai Richárdnak, munkatársamnak és barátomnak, aki kifogyhatatlan jó szándékkal, kíméletlen kritikával, gyakran pedig saját két kezével segítette munkámat és fejlődésemet.

Együttműködőimnek Radicsné-Ráczkevi Juditnak (Szarvas Fish Kft), Catherine Ozouf-Costaz-nak (párizsi Természettudományi Múzeum, Franciaország) és Genhua Yue-nak (Temasek LifeSciences Laboratory, Szingapúr) akik tevékeny részvételükkel előbbre vitték munkámat.

Egedi Sándornak és Bolyós Tivadarnénak, akik a laboratóriumban és az állatházban végzett munkájukkal lehetővé tették, hogy el tudjam végezni a kísérleteket.

Dr. Graham Mair-nek, Prof. Arlo Fast-nak, Radics Ferencnek és Pasaréti Gyulának a kísérleti állatok és minták gyűjtésében nyújtott segítségükért.

Sóvári Krisztinának, Szabó Gyulának, Galli Györgynének, és Kurjákné Korom Editnek a mindennapi munkákban és az életben nyújtott állandó segítőkészségükért és hasznos tanácsaikért.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni menyasszonyomnak, családom minden tagjának és barátaimnak, azt a támogatást, megértését és türelmét, amely nélkül nem juthattam volna idáig.

11. MELLÉKLETEK

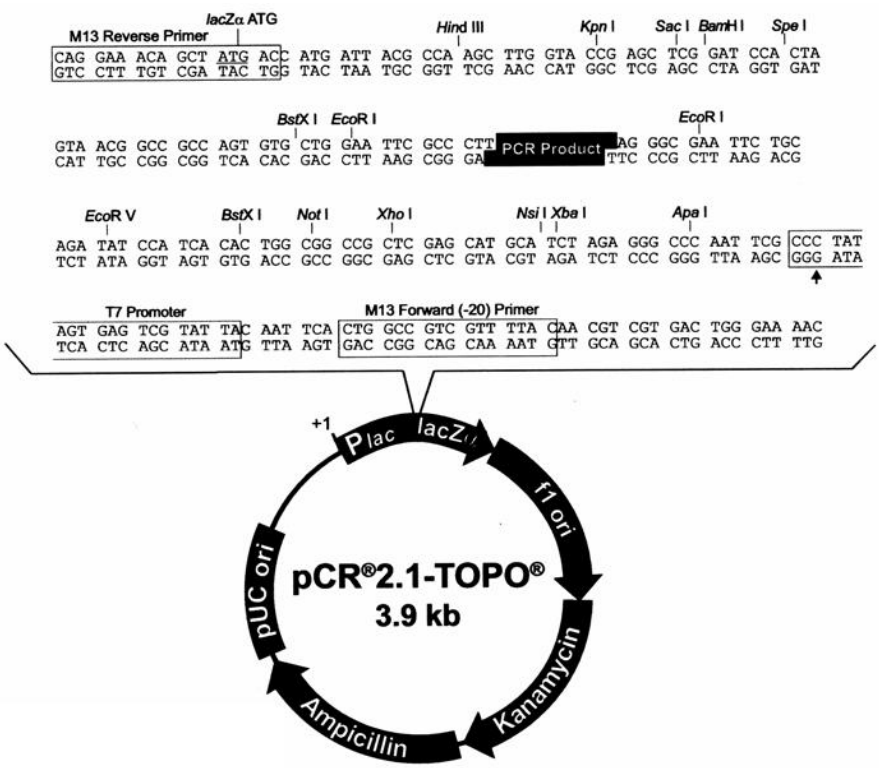
M1 A FELHASZNÁLT PUFFEREK ÉS OLDATOK

0.5x mosó oldat:	0,5xSSC; 0.1% SDS
1xTE puffer:	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; PH:7,2
20xSSC:	3M NaCl,; 5M trinátrium citrát; pH 7.0
2 x mosó oldat:	2xSSC ; 0.1% SDS
Acetocarmin:	10mM carmin; 45% ecetsav
DIG-dNTP mix:	1mM dATP; 1mM dGTP; 1mM, dCTP; 0,65mM dTTP; 0,35mM DIG-11-dUTP (Roche)
High-SDS-Hyb puffer:	7% SDS; 50% deionizált formamid; 5xSSC; 50mM Na-foszfát; 2% blocking reagens (Roche); 0,1% N-lauroylsarcosin
LA- táptalaj:	1% bacto-trypton; 0,5% bacto-yeast extract; 1% NaCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $CaCl_2$; 1,5% bateriológiai agar
LB- tápoldat:	1% bacto-trypton; 0,5% bacto-yeast extract; 1% NaCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $CaCl_2$;
Ribonukleáz-A oldat:	10mg/ml RN-áz A; 10 mM Tris-HCl ; 15mM NaCl; PH:7,5
SET pufferben:	10mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 200mM NaCl ; 0,5% SDS; pH 7,8
TBE puffer:	90mM TRIS; 90mM bórsav; 5 mM EDTA; pH:8,0
TBE-stop puffer:	3xTBE; 20mM EDTA; 50% glycerol; 0,25% bromfenolkék

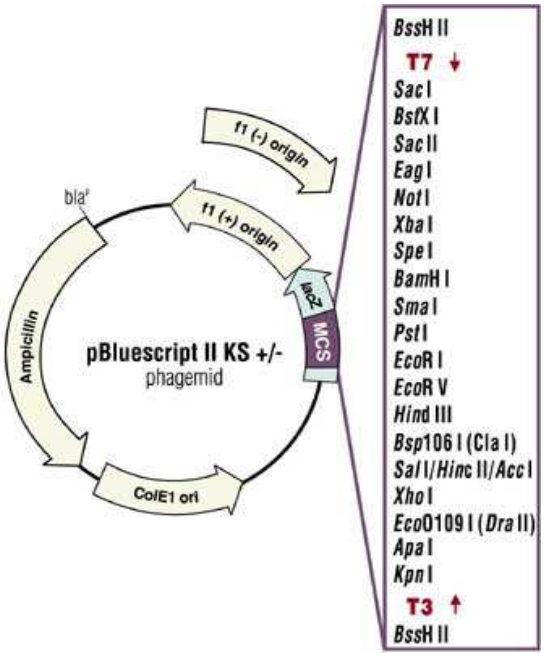
M2 A FELHASZNÁLT 598 RAPD PRIMER LISTÁJA:

Sorozat	Primerek sorszáma	Gyártó	Darabszám
#2	101-200	University of British Columbia'	100
#8	701-800	University of British Columbia'	100
A	01-20	Operon Technology	20
AA	01-20	Operon Technology	20
AB	01-20	Operon Technology	20
AC	01-20	Operon Technology	20
AD	01-16	Operon Technology	16
AE	01-20	Operon Technology	20
AF	01-20	Operon Technology	20
AG	01-20	Operon Technology	20
AG	01-20	Operon Technology	20
AH	01-20	Operon Technology	20
AJ	01-16	Operon Technology	16
AO	01-10	Operon Technology	10
BC	01-20	Operon Technology	20
BD	01-20	Operon Technology	20
BE	01-20	Operon Technology	20
BF	01-20	Operon Technology	20
BG	01-16	Operon Technology	16
F	01-20	Operon Technology	20
M	01-20	Operon Technology	20
O	01-20	Operon Technology	20
Q	01-20	Operon Technology	20
Összesen			598

M3. pCR2.1-TOPO VEKTOR FELÉPÍTÉSE



M4. BLUESCRIPT KS+ PLAZMID VEKTOR (STRATEGENE) FELÉPÍTÉSE.



M5 AZ IVARSPECIFIKUS ÉS KONTROLL FRAGMENTEK MARKER SZEKVENCIÁI

Név: Cga_Y1
GenBank Azonosító: AF332597
Hossz:2584 bp

```
   1 GGCACGTAAG TACTAAATTG TAGCATCTAC AAGTAACTGC TAAATTGTGA AGACTGTCCT
  61 TGTCAAACGG AGTATGAGAC ATGGCTTAAT TTGTGTTCTT GACTTTAGTT TCGTTGCACA
 121 CCTTCAGGAA AGGCAGTTAA AGCCAACAAC CCAGAAACTG TATTTGCTGG ATGTAGTGGC
 181 TTTCCTGAAA TACATTTTAA ACGTTTCACC ACCATCTGTC AGACTTGGGA CTGAAGGGAT
 241 CAATGCTCTC ATGGTGGAGT TGAAGGCTCG TCTAAGATAT TGGGCGGGAC GTTGTTGGAC
 301 GCCAGCTGAA AGTGCGCCGA TCAAAGTGCG GTAGGTTTGA GATACAAGCC TCTACCTATA
 361 TTGCTTAACA CCACATTAAT GAAGAAATGC ATGTATAATG AATTGTATTT ATAATTTCAG
 421 ATAGACTTGT TGATGCCGGA AAACACCATC TGTTCATTGA AGCGACTTCT GAAACTATTG
 481 CTGCAGCACT TGGTAGGGAG CTCTGACTAG AAGATTTTGA AGGAGGCACA TTTGGTTTGG
 541 CTTGAAAAGC AGGTTTGAAG CTCTCTAATG CCAGTTCCTT TGTAACATTT ATCCTCTCTA
 601 CATGTAGAGA GTGATGGTAG GTTTCTTCAC TTGGTTTCTT CAATCTCTTG AGCACATTTT
 661 AACACTTGCC TACAGAGTGA GCATAAATAA ATTAATACAG CATTTCTGAT CCCATGTTGA
 721 ACACAAGACC AAAGTAAGGA GCACAGAATC TTTAATGGCA GTTAGATTTA GAGCTACCTC
 781 CCCAATACAC AAACACCTAG AGACCAACTT CAAACATACC TCAAGTTTGT GGATTTTTTG
 841 CAGGTGCTTG TCTAGTCTAA TGTATTTAGC CTTGCAGAAT TAAACTGGAC AGGTGGTGGA
 901 TGTAGGAGCA TCAGGCCAGA GGCATCAGAA GTAGGCTACT GCTGTCTCAA AGTAAAGCTG
 961 TAGAAATTAA ACAGATTATT TTAAAACAAA AAAGGCATTT AAGCATGTTG TGCATCAGAT
1021 GCAGGTACAA ATGAAGCCTA GAAAAAAGAA AACAGGATAC TTACTGTCAG TGAGAAAGTT
1081 TGGGTAAAAG AGCAGATTCA GTAACCTTTT CTGTGGACCT TGGGTGCTGG GCTACATCAG
1141 CATACACTTG ACCACAAATG GGACACCTAC AGGTATGTCC ACCTGTTCAA TCGATGCACC
1201 TTCGAGACAG CCGTAGCCTG CCACTCTGCT CCTGATGCCT CTGGCCCAAT ATTCCTACAT
1261 CCCCCCCTGT AAACATTATA TTCACAAAAG AGAAACATTT TTAGAAATGC TGCATCACAA
1321 CCATATTTTG GGGAATAGAG ACTCATTAAT GAGCTGTTAA AGGGTGCCAG TCTGCTCAAG
1381 ATTTACAAAG ATATCTGCAT GAAAAACAGT GATGGTTTTA ACCAAGTCCT ACATATAAGC
1441 TTAAACAAAA ATTCACAATA ACCAATAACA CACTACCTGC ACCCTACAGA TATTAAGGCA
1501 TGTCATTATT CTTTGCTTCT TACCTGAACA CTGACAACTT CTCCCTCCAC TCAAGAAATT
1561 CTTCCATCAA AAGACCTGCT ATTTAAGTGC TTAAACTAAT TAACAAGTCT GATCTGATTG
1621 GCTGCAGCTC CATTAATTGT TTACTGCACC TGATTGTGTT CAGTTCATCA AAGGAACACA
1681 ATCTTATCCT TGGAATTTCA CTGGATTGGG AGCTACTGAG ATGTTTTAAT GATTTTAATG
1741 TTTTAAAGTC TAAACCTTTT TCTTTAAAAT TAATTCAATA AATTCATTAT ATAAAGTTAA
1801 AATGATCCTT GGTTATGTCT TTCTTACACA ACAGCAAAGG CCTTAAATAT GACTCCAAGT
1861 TTCAGCAGTT CGTTGGGACC AACTTTTCAG CATATGATGG TTCAAAGACC CAACTTCTAG
1921 ATTTAAGTCC CTTAACTATA AAAGCCAGTG AATAAGAAAT TCACTCATAC TTTGGTCATG
1981 GTTTAAATTG AACATTTATG AAAAGAGCAT TTTGCAAAAG CACATTATTC ATCCTCTCCG
2041 AGGTTCCCCA CTGGTCCAGT GATAAGGACT GTGTTTACCC AGAAGTGAAA CACCTTATTC
2101 CTTCTTATCT CCCTTCCATC CCTTGATAAT GCTCTGTTTT TATTAGAATT CGACTTTAAT
2161 GTCTCCACAT ACTGGAAGTG GTTGTCTTCG CGCTGTGTGT GCTAGATTAG ATGTATGTAT
2221 TTTAACTTTT AGTTGGTAGA TGACAAAATG TGGGGTTCAG TTCCCACCAC CGAACATTTT
2281 TATGCTTCGA AACCAGAAAA CATGCAGCAT CGTCAACATT GGCTCTGAAC ATTCCAGCGT
2341 TGTGCTCTTT TTTTTTTTAC ATATCTCTCT CTGTGGCTAA TTTTACACTC ACCCCTGAAA
2401 GGACAAGGGT TTCTGTGGGG CAATGGGGAG TCAGGGTCTG CCCACTCCTG AGATCCAGCT
2461 AAAAGCTTTG TTAATGCAGC AACGTTAATA TATGATATTG TTTTTAAAAG TGATTGTGCT
2521 CTTTTTTGGT TGTTTCCCTG TCAATGCCTA ATTTTGCTAC CACACATACA TTAGCTTACG
2581 TGCC
```

Név: Cga_Y2
GenBank Azonosító: AF332598
Hossz: 483 bp

```
  1 GAATTCGCCC TTTCTGTTCC CCCCCCCTTT TTATTGTCTG TTGCGGCCTG ACCCTAGACC
 61 AGGACGTAAC ATTACTATAA AGAATTTCAA ATGAATTAAA TTTGTGTCCG TGTTTTTGTA
121 CAATAGTCAA ATTATCATTG TGAATAACTG CGATGCCTCC TCCCCTACCA GTTAACCGAG
181 GCTGATGTAT GTGTCTGTAT CCAGGAGGAC TAGCTTCATT AGAGCTACAT ACTCATCCTG
241 TTTAATCCAG GTTTCTGTTA AACAGAGTAT ATTAAACTCC TGATCCGTGA TAGTTTCATT
301 AACTGTAAAT GCTTTAGATG TGAGAGATCT AATATTTAAC AGTCCTAGCT TCAGATCAGA
361 GGTGCCGGGT GCGCATTCAG TGTGATCTGA GTTTGTGGTC TTTATGTTAA TTAAATTACT
421 AAAACAGACT TTCTGAGTTT TTCTAAATTT GTTTTTAGCT CGGGGAACAG AAAGGGTGAA
481 TTC
```

Név: Cga_K1
GenBank Azonosító: AF332599
Hossz: 691 bp

```
  1 GGGCACGTAA GACCGATTGT TTGACCGTGT CGTAATCCAA ACTTTGCTCG ATAGGCAGCG
 61 CAGAGCACAC AGCCTGCGCT TTACTTAGTC AGCTTACATT GTAACAAGAG AGCCCACATC
121 GCTCTTGGCC ACTGTAACGT AGCCGCCACA CGCTCAAAAG CTATAAAATA GCTAGGTACT
181 AAAACAATAT GCTTGCTTAC ATCAAACTGG GGTGGTGGGG TAGTAACTGG GGCAGAAAAG
241 AGAGAAGAAG AACCCGGCGC AGCTGCTGCA GGTAACTGAG CGAATGACGG AGAGGCAGGG
301 GAATTCTCCG GCGCGCTCTC AGCCCGGTGT AACCAGCTAA AATCTCACCG AAAATGCTCC
361 CGCTCCATCT CAAGCTCCAG CTCCCGCAAC CGAAGACTTT GAGTCTCCGT TTCCTCTCGT
421 TTTATTTCCA GCTCTACCTC CCTCGTTTTT AGAACCAAAA GTTGTTCTGA TCTGTCAATT
481 GGTGTTACTG GTGGGTGATT TCATTACCTT ATGCCTGGGG GGGCATGGAG GGTGACTGTG
541 GCGCAACCGA CGGCTTACCG TCGAACTCCG TCAGTGTTGA AGCGTCCTCG TCCTCAATGT
601 ACTCTCCCGC CACCTGAGGT AAAATCTGCG GCTCAATTAG TGTGCTACGC AAATATTTTT
661 TTTATCTCCT TTTTCAAGAC CCTTACGTGC C
```

M6 A CgaY1 SZEKVENCIÁVAL LEGSZOROSABB HOMOLÓGIÁT MUTATÓ Clarias batrachus KLÓN SZEKVENCIÁJA

Név: A08
Méret: 325 bp

```
  1  CCTAGTTGGA CTACAGAGGT TCCTAGATGG ATTAATGGAT GGTGGAAGAT
 51  ATGTGCTGTG AATCTACAGT ATGTGAACTG CTTGTATCTC TTTTTTTTTC
101  ACCATTGCAG GTTGCATCAG TCAGAAGAGA AGTTTAAGGT GCATGGCTGC
151  ATCACTAGTT GCAAGTTTCT GGTGGCAGCT GGCTACAGAG TAAAGGTAAT
201  ATCAACAGGT TCTGTTATAC TGTAAATGTT ATAAATATAG CAAAGGTCAT
251  TTAAGATCAC TTACATTGAT TATCAATTAA TAAACTGGTG ATGTGCGCAC
301  CCAAGCATCT ATTTCTGTGG GGATC
```

M7 A HOMOLÓG-KERESÉS SORÁN AZONOSÍTOTT CLARIAS BATRACHUS MIKROSZATELLIT PRIMER SZEKVENCIÁI.

Azonosító	GenBank Azonosító	Primerek (5'-3')
*Cba*01	AY169256	F: CTGACTTTCTCACTCCGCCTCCAT R: CGAACACCCCGGCACTCG
*Cba*02	AY169257	F: GCCCTGCGAACATCTCCA R: TGGCTCCAGCACTCACAAA
*Cba*03	AY169258	F: ACAGCAGACATGCGTGTAAGGATT R: TACTGTGGCTGTCAGAGCATC
*Cba*04	AY169259	F: CCAGCGCACCCTGAGAAAT R: GATGGCAGGAGTGGTCCAGAT
*Cba*05	AY169260	F: ACATTCCAAAGACACGTAGGTTAG R: CCAGGAGACTTAGGGCACAT
*Cba*06	AY169261	F: CAAACCGCTGGCATAAGACA R: GAAAGGGTCAGCGAATACACAT
*Cba*07	AY169262	F: GACGCATCAAAGAGTCCGAGTGC R: CAGAGATGACGAGGTGCTGGAGTC
*Cba*08	AY169263	F: TATTTTCACACAACGTACATCGTG R: TATGAAGGCACGTCATAACTGC
*Cba*09	AY169264	F: ATATAACGCGTTGGGGCACAG R: TCCGTCCAAAGACATGCAGAGTAG
*Cba*10	AY169265	F: CCAGTAAGCCAGACAGCGGTGAC R: TGGCGTGAGTGAAACAAGAAAAAG
*Cba*11	AY169266	F: CACCGCGCTCGTCATTCCATAGA R: CTGCGCGGGTTTCAGAATGTTAGG
*Cba*12	AY169267	F: AGGCATCATCCCTGACTCTTACG R: ACGCCGGCTGTGTTTTCATCT
*Cba*13	AY169268	F: ACCAGGCGAGACGGAAGC R: ACCTGCGCGGAGACGAGA
*Cba*14	AY169269	F: GGATTTGAGTGCGGCTGTATT R: CCATCACCTTTCCTCCTCCTG
*Cba*17	AY169270	F: AACCGCCATAATAAAAGTAGTCCA R: CACACCAGCAGTAACACGAGTC
*Cba*19	AY169271	F: CAGGGCTAAATTACCCATAATCA R: GGCATGTGTTATAACATGTGAGG
*Cba*20	AY169272	F: GAAACACGCCATCATGCCTAATA R: CCAAACGGAGCGGACAGG
*Cba*21	AY169273	F: AGTTGGCAGCTTGCTTTCCTCAA R: AGCAAACGCAGCGGGATTGTA

M8 A CLARIAS BATRACHUS GENOMI KÖNYVTÁRBÓL SZÁRMAZÓ MIKROSZATELLIT TARTALMÚ KLÓNOK SZEKVENCIÁI

Név: *Cba*01
GenBank Azonosító: AY169256
Méret: 1035 bp

```
   1  GNATCCGTCC TGCCTGTGCC TGTCTGCTGA TGTTCATCTG TACAACACGG
  51  TATCATGTCT TATTGCACTC TATTATCATG GACAATCTCT GCGACATCCC
 101  ATAATTCCAC TGACAGGACG AACACCCCGG CACTCGGAGG GGACTGGGTG
 151  TAAATCTTTA GAGATGTTTC TCTTAACGTG ACACAGCGAT AATATTGTAA
 201  ACTGTAGTTA TAAATATGGC ATCTATGCGC ACACACACAC ACACACACAC
 251  ACACACACAA AGACAAAAGG CCTCCTCATC ATCTGTGGAA GTCATGTGAC
 301  TGGGTGATGT CAATAACAAG CCAAATGTTG CTCATATGAC CATGGAGGCG
 351  GAGTGARAAA GTCAGGGACA AGGTGTTCAC TCAGTGACTC ACAACTCACT
 401  GAATCATTGA TTAACCAAAT CATTTAATCA CTGGTTCGCT GCTCAATGAA
 451  CCACTGAATC TCASACTCAG TGAATCATTG AAGTCCCGAC TCATCAGATT
 501  ATTTAAATCA CATGAACCGC TGCATCGCCA GCTGAATGAC TTCTATCGCT
 551  GACCCAGTGA ATTACTGAAT CACAAAGTGA ATGGAACGCT GAATCAATGA
 601  ATCACTGAAT CTCCGACTCA CTGAATCACT CACTCGGCAT CATGTCTTTG
 651  TGATGGCGCA TGATGTGTTG GTTTTTCTCC GACGGTCTCC GGAAGCCCTT
 701  GGAGCARAAC TGGCAACGAT GTGGATAATC CTTGGTGTGG ATGGAAATGA
 751  CGTGGCGTTT GAATCCCGAG GCGTYTCCAG TGCTATAGTC ACAGTACTGA
 801  CACTGATACA CACGCCGCTC CCTTGGTCCC TTGGCACCGA TCACCTTTTT
 851  AATGATGGGA GCTCCGCCCA GAGCCAGCTG CGCCGCCCCG ATCGTCTTCT
 901  TGGGCGGACT TCGCTCCTGC ATCTGTAACG AAGGCGCCGG TTGTTCTTCT
 951  TGCTGTTCTG TCGCGTTCTG TTGCGTCTCC TGCTGCTGCT GTTCTTTAGT
1001  GTGAACGGAT AAAATGTGTC GACTCAACAC AAATG
```

Név: *Cba*02
GenBank Azonosító: AY169257
Méret: 500 bp

```
  1  GATCCAGAAT AATCGCGCGG CTTTAACCAG ATTTACGTCT TACGATCAGA
 51  AAGAACCGGT AAAGAAATGA AACCTCGAGT GCGCTGATTA AAAAGTGACG
101  TGCAGTTTGG AAACCCTGGC TCGCCGATAA CAACTACCTG TTGATGAGCC
151  GTGCAAACGA TCCCGCCGGA GAGAGAGAGA AAGTCTGAAA TGCCACATGG
201  TTTTAAAAGC AAAGGTCACG ATCTAAAAGC AGATGGTGGA GTGAACAATC
251  GCCCTGCGAA CATCTCCACT CCCACTGCAG GTGTTTCCCT CCGAGCGGGA
301  CTGAGGGGCG CGGACTGTCT TCCCCCTGCC AGATAAAGGC CTTTTACACA
351  CACACACACA CACACACACA CACAACACTC TTGCATCTGA TTAGTGCTAA
401  NCAGCTGTCC TTTGTGAGTG CTGGAGCCAG TAACACGATG ACTCCCCTCC
451  GTNCGCCGGC CACCATAATC AGCCANATGG CACGAAAGCG TGACNGAAAA
```

Név: *Cba*03
GenBank Azonosító: AY169258
Méret: 1057 bp

```
   1  GATCCCGTTC GTTAAAAGGC GTCGCCTGCA CGCGAGACTT CTATTTTGTA
  51  GCCAATCAGC TTCGAGCTTA GGACCTCGGC GGGGGCCATC GGCCAATTAG
 101  CGGAGAGGAA GGCGGGGGCT CGTGTCTCTC TTGGTGTCGG TGCTTTGAAA
 151  GCGGACTGCT CCGGCAGGAG GAATGCACAG CGCGTACGGW SKGTKRTATT
 201  CCATGTCCGT GKTGGTTAAA TTTACACGAA TTACATCCGT CAGGGTTGCC
 251  GAGTGCTGGG CGTTTTAWTA TTTTTTTTCC TAATTCCGCA CTGTCCATAG
 301  AGCTTGGAAG GTTTAACTTG AACTGRAGTG GACAGCGAGT GTAGCCGGAG
 351  CAGCGTGGGT TAAGGTGGSC CTTGCCCGGA TATCTGTCTG CCAAGCAAAC
 401  TGAAAAATAA ATAAATAAAA CCMCAATACA AATAAAATAA AAGCATTATC
 451  GAAGTTTCAT TCATATTGAC ACGCGTTCGA ATTGGAGCTT CGTACTAGAC
 501  AAGAGGACTA AACCACGCTG CTGCAAATGG GTGAGTGCTG CTTTATTACA
 551  CTTCTGAGAA TGGAGATGTG CTGGTGTTCC TGAAGGTGTG ATTCAGGTTT
 601  ARATAGGCAG CAAGCGGCTC GATGGTTATC AGTCCTCGTT TATGTTTAAG
 651  CCAGAAAGCT GTGTGAAATA TCTGCCTTTT CCCATTTARA CATATTTGCT
 701  TGTTTGTTGC CGTTACTGTG GCTGTCAGAG CATCAAGGGA GGAGGAGGAG
 751  GAAGGAGGAA RARAAAACAT GAAGCAGCAG TTTAACTGTA CATGCTCAGT
 801  TCAAACAGAG CAGATTACTG CAAAATAAAT CCTTACACGC ATGTCTGCTG
 851  TGCTAATGAT GATGTAACGT CTTGGARTTG ATGCAAATCA ACAAGGCTTA
 901  AATACAGACT ATTYTGGATT TKGTCAAAGC TTCACTGTAA ATGTTGCTGC
 951  TGATGTGAGA GAGAGAGATC AGACATCAGT GATCAGCAGA ATCTCAGCTG
1001  AATCACATAC ACCGAGTCAC TCATTACTGT TAATCAGCCC TCACATCAAT
1051  CTAGGTG
```

Név: *Cba*04
GenBank Azonosító: AY169259
Méret: 568 bp

```
   1  AAGGGNANCA AANNCTGGGT NACCGGGNCC CCCCCTNCGN NGTCGNACGG
  51  TNATCGNANA AGNCTTGNNN ATNCGNAATT CCTGCAGCCC GGGGGNATCC
 101  TCTGCGTTTA TGCCTCGCAC ACCCCAANAA CCATGACACT TTCTGNACAA
 151  TTTTTCAGGT TTGTGTAGGN AGATAAAACT GACATAAATA TGAAAACACA
 201  CACAAAAATG TGTGGTAAAG AAGACCATCA TATTTTGCTG TTCTTTGACA
 251  AAGAAGTTTC TTTGTCAGCT TGAGTTATTT CTACTTCATC TGAAGATGAG
 301  TAATCATTTT CTGGGTTGTA ACCCATTCTT CAGATACATC CTCCTCTTCC
 351  ATATCAGGGT TGTGTTTTCC TCCAGCGCAC CCTGAGAAAT CAGATCTGCA
 401  ACTTGATGGG CACTGAAACG AGCACAAATT ACTTCGGAAA AAAACAACTT
 451  GGTTACAACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACATACA
 501  NAATATCTTT CTCATTCCAT AAAANTAAGT GTGATCTGGA CCACTCCTGC
 551  CATCTATGAA AGNGATTT
```

Név: *Cba*05
GenBank Azonosító: AY169260
Méret: 644 bp

```
  1  GNATCCTTGT TAAAGTCACA CAAAAAGAAA ACGTTTCCAG TAAGCCAGAC
 51  AGCGGTGACC TCCGTTAGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTATG TATGTGTGTG
101  TGAAAATCGT TCTACACCCC ATCTCCTTCT CCTTTTTCTT GTTTCACTCA
151  CGCCAGCTAC GATTCTTTTC AATGTTAAAG TGCAGATTAA TTTGTGTTAT
201  TTTTACTTTT TACATGCAAG TTACTGCCAC AGAAAAAACA GATATACCTC
251  TGAGGTTGGG AGTATTCATC GCTTGGTCTG CCGGCTCAGC AGGATGGTGA
301  GCGGTGCTGT AGTGGTTAGC ACTGTCTCCT TGCACCTCCA GGGTCCA:GG
351  CTCGATTCCC GTCTTGGTGG TCTCCCCGTG CTTGGTGGGT TTCCTCCGGG
401  TACTCCGGTT TCCTCCCACA TTCCAAAGAC ACGTAGGTTA GGCTAATTGG
451  CGTTCCCAAA TTGCCTGTAT TGTGTGAATG AGTGAGTGTA TGTGTGTGTG
501  TCTGTGCCCT GCGATGGATT GGCACCCTGT CCTGGTTGTA CCCTGCCATG
551  TGCCCTAAGT CTCCTGGGAT AGGCTCCAGG CCCCCCGTGT NCCCTGAATA
601  CAGGATTAAG CGGTATAGAT GATGAGTGAG TGTGTGAGTG GATC
```

Név: *Cba*06
GenBank Azonosító: AY169261
Méret: 314 bp

```
  1  GATCCATGCT TTAACATGCG TAAAATAATT AGCAAACCGC TGGCATAAGA
 51  CAGGAAAAGC TTATGCGTCA TCTACCTATT GTTCCTGGAA TACTGGAATA
101  GATTCTCTAT TACAAGAGAT TACTCAGTTT CATTTACAAC AACAACAACA
151  ACAACAAACT CTCAGTTTAC TTCTCTGCTA AATGAGATGC GAAGTAAGAC
201  CTTTACCTCA TTTTGAATCA ATGTGTATTC GCTGACCCTT TCCACTGCAA
251  CAATGTTGGT CTCCAGCTCT GATGTCATTC TCACAAGCCA GTTCAGAGTC
301  TGGGTCACCT AATG
```

Név: *Cba*07
GenBank Azonosító: AY169262
Méret: 369 bp

```
  1  GATCCTCGTC TGTGTTTGTG TCTCCTTCCT GCTCCGCCTC CGCGTCGCGT
 51  CCCAGCTGAC CTTGTTTTTA ATTTGCTGGG CTGGAGGACG ACCTTGAGGA
101  CAGAACGGTG AGAATAAACG AGCAGAACAA CGTCCTGATT GGGTTCTTCA
151  TCACAGACGC ATCAAAGAGT CCGAGTGCTG TCGTGATCCT CCACTCCTTA
201  TAAAACACAC ACACACTCCT GATACTCGTG TGTCTTATCA GCATCCAGTC
251  TGTGTGTGTG TGTGTGCGCG CGCGCTTAAC TTACCTAAAG TTATAAAGTT
301  TATATCTCAT AAGTTATACT ATAAAGTAGA AGTTATCTCA TACTGTGACT
351  CCAGCACCTC GTCATCTCT
```

Név: *Cba*08
GenBank Azonosító: AY169263
Méret: 380 bp

```
  1  GNATCCCATC TAATAGCGTG TAGGATCTTC AGCTCCAGTC CCCAGGTGAC
 51  TAGGAACTCG TTATAATATA CAGGCACTCG TCATGTGACT AGGGCTCGAC
101  ATAACACATT AATATTGTAA TGAGCTGGAG TCACATGACC TATAGTGTAT
151  ATATCGATCT ATATATACAT CTCAACTTAC AATATATTTT TGGACTTATG
201  ATGCGTTTAT GAAGGCACGT CATAACTGCA GAACCTTCTG TACGCTACTG
251  TTCATGACAA CACACTGTAC ACGCCCTGTG TTTCTGAGGA CCAGCGCTAA
301  TGTAATCACA CACACACACA CACACACACA CACACACACG ATGTACGTTG
351  TGTGAAAATA TTATAATTAT AACAATATTT
```

Név: *Cba*09
GenBank Azonosító: AY169264
Méret: 420 bp

```
  1  GATCCCTGCC TCGGGTCCGC CTGTGCGTAG AGTTTTTTTA CATTCTCTCA
 51  GAACTTGGTG GTTTCCACCT TTCTCATCTT TCCGTCCAAA GACATGCAGA
101  GTAGGCTAAT TGGAGTCTCA CACACAGTTG CACGTGTGTG TGTGTGTGTG
151  TGTCCTGTGA TAGACTGACA TCCTGCCCAA GGTGTACCCC GCCCTGTGCC
201  CCAACGCGTT ATATAGAATT AGAGAGAAAG TTACTTTATA GCTAAGTCAN
251  AAATCCCATT TGTATGACAT TACCATAGGC TCCTACTCAC AGGCTAAAAG
301  TGAACAATAT ATAACATGTA GCCAAAGGTG ACGATATAAG TAGAACTCAA
351  AAGCCTCCCG AAACAANAAA TCTAGTTCTC GTTAGAAGTT TCTGTGAATT
401  CCCTTGAAAT GTACTACAGC
```

Név: *Cba*10
GenBank Azonosító: AY169265
Méret: 644 bp

```
  1  GNATCCTTGT TAAAGTCACA CAAAAAGAAA ACGTTTCCAG TAAGCCAGAC
 51  AGCGGTGACC TCCGTTAGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTATG TATGTGTGTG
101  TGAAAATCGT TCTACACCCC ATCTCCTTCT CCTTTTTCTT GTTTCACTCA
151  CGCCAGCTAC GATTCTTTTC AATGTTAAAG TGCAGATTAA TTTGTGTTAT
201  TTTTACTTTT TACATGCAAG TTACTGCCAC AGAAAAAACA GATATACCTC
251  TGAGGTTGGG AGTATTCATC GCTTGGTCTG CCGGCTCAGC AGGATGGTGA
301  GCGGTGCTGT AGTGGTTAGC ACTGTCTCCT TGCACCTCCA GGGTCCA:GG
351  CTCGATTCCC GTCTTGGTGG TCTCCCCGTG CTTGGTGGGT TTCCTCCGGG
401  TACTCCGGTT TCCTCCCACA TTCCAAAGAC ACGTAGGTTA GGCTAATTGG
451  CGTTCCCAAA TTGCCTGTAT TGTGTGAATG AGTGAGTGTA TGTGTGTGTG
501  TCTGTGCCCT GCGATGGATT GGCACCCTGT CCTGGTTGTA CCCTGCCATG
551  TGCCCTAAGT CTCCTGGGAT AGGCTCCAGG CCCCCCGTGT NCCCTGAATA
601  CAGGATTAAG CGGTATAGAT GATGAGTGAG TGTGTGAGTG GATC
```

Név: *Cba*11
GenBank Azonosító: AY169266
Méret: 583 bp

```
  1  GATCCATCCC AACAACTTCC AGGTGCCAGT GTAACGAGAT AATCAGTGTT
 51  ACTCACTTCA CTTGTCCCCT TATATTTAAC GTTAATCCCC TTATGGATGA
101  TCGGTGTAGA AAATCTTAGA TTTATTTTGT AATTAAGTTG CGAGATGGCA
151  TTATCTCTAA CGAAGAGAGC GATGGGCAGC AGGGCTTTAG TGTTTTCGTC
201  CACTCAGCTT TCTTTGTACG TTCTGCTCAG GTGGATCAGA GCTTCAGTGT
251  TCACGCCTCA ACACCACCGC GCTCGTCATT CCATAGACGG AGGAGTCGCT
301  AAATAAACAC ATTTTATAAT TCAGTATTGT AACGTTGATG TTGTTCATTG
351  TGATTTTCTG CAGTAAAAAA CTCATTAATT GTGAGGAGAT GGAAGAATCT
401  GTTTTTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GGGACCCTCC ATTTACTCTC
451  GGGGCATTCT GTGGTTTGAG CGTCGCTCGT TCAGGGCATT CCTAACATTC
501  TGAAACCCGC GCAGCACGCC GGCTGTGTTT TCATCTCCGT TCCGCCTCGT
551  TTCCGCTGCC CTTTTGCCCT GGATGTCAGC GTT
```

Név: *Cba*12
GenBank Azonosító: AY169267
Méret: 258bp

```
  1  TGAAACCCGC GCAGCACGCC GGCTGTGTTT TCATCTCCGT TCCGCCTCGT
 51  TTCCGCTGCC CTTTTGCCCT GGATGTCAGC GTTGTGCCTG CATTGTGTGT
101  GTGCGTGTGT GGATGTGTGT GTGTGACCTG CGTAAGAGTC AGGGATGATG
151  CCTGGTTTTT TGTTGGGCAC AGAAAGAATC TGATGAATTG GAAAAAAATN
201  CATAAAANAA ACATGGCANA AACTCCAGGC TTCTGTGTGT GTGTGTGTGT
251  GTGTGTGT
```

Név: *Cba*13
GenBank Azonosító: AY169268
Méret: 504 bp

```
  1  CGGCTGGCCG AAGAGTCAGA AAGACATCTG CCACTTGGTG TCACTTCCCC
 51  ATTCCATGCC TACTTCATAG TTTCCTGAAG ATCATGTACA GAGATGAGTT
101  CACGCACTCA TCTCTAGATT TGGGCTTGGT CACGTTGGTC ACGCTAACTA
151  CAGGAGTCAC GCCATGTACA GGATTTATTC CATCCATGAA CTAAATCTAA
201  TGAGCATGAA TGTTCAGACG GACACATCAG GTGAGAAATC ACCTGCGCGG
251  AGACGAGACT AGAACCAGAA CAGGTGGCAT ACAGTGTACA GTTACGACTT
301  TGTGCATTTA TGTTCTGTAT GTATGTACTG TATGTATGTA TGTATGTACT
351  GTATGTATGT GTGTGTGTGT ATATACTGTA TACTGTATGT GTGAGTGTAA
401  AGGAGTAAAG TGTTACATAC AGCACGCAGA TGCAGTAGGA GCCCTGGACA
451  GTCTCGCTGT CTCTGATCAG GAAGCTTCCG TNCTCGCCTG GTGGCTCCCA
501  GGAT
```

Név: *Cba*14
GenBank Azonosító: AY169269
Méret: 305 bp

```
  1  GATCCGCACT CTCAGNACCT TTGTTCTTCC ATCACCTTTC CTCCTCCTGC
 51  CTGGGTGAGG AAGCTCACTG GCACACTGTA ATACACACAC ACACACACAC
101  ACACACACAC ACACATACAC ATCCCCTTCT TTCCTCTCTA TGCTTTACCT
151  TCCCTACCAT TGTGACTTTT TGTTTGTTTG TCTTAATACA GCCGCACTCA
201  AATCCGTACT AACGTACGAA TAAAACATGC ACACACACAC ACACCCGAAG
251  AGGACAATAA AAAAAAAACA ATACAACAAA AACAACACTG GGCCTCTCCA
301  ATTCA
```

Név: *Cba*17
GenBank Azonosító: AY169270
Méret: 328 bp

```
  1  GTTCCATACT GGGGAACTCT AGNACATTTA TTTACTCATT TACATTTAAA
 51  AGCCTCATTA AGAACCGCCA TAATAAAAGT AGTCCAATTA CTTCTGTATA
101  ACTGTGTGTC CAAGCAGACA ACATACACTC CAGTGCAAAC GAGGCATGCA
151  GCACACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACAGACACAC TGCACCACAG
201  CAACAGGAAC ATCAAGTTAA ACCTCTTAAC GTAAAGAAAT CGATTCCATA
251  GACTCGTGTT ACTGCTGGTG TGCANCAGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
301  TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTG
```

Név: *Cba*19
GenBank Azonosító: AY169271
Méret: 270 bp

```
  1  GATCCCATGC CAGTACAGCA GGGCTAAATT ACCCATAATC AGGGCGTCAG
 51  GGTGGATGGG TCCATCGGAA CCTAACACTT ACACCCCATC ATCAACACTT
101  CTATGTCAAC CAATCCCATA TAGCCACACA AATGGAGCAA ATTGCAATCA
151  TTTGAGCTCC CACACAGTCT ATATTATGGA GATGTGTGTG TGTGTGTGTG
201  TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGAGAGTG TGTGNGCCCT
251  CACATGTTAT AACACATGCC
```

Név: *Cba*20
GenBank Azonosító: AY169272
Méret: 429 bp

```
  1  GATCCGCTTA CACGTTCCCG CTTCACTGTG CGGAGAAAGA AGGGCTCTTT
 51  GATAGCACTC AGATAGGCTA TTTGTTTCCT GGCCACATGG CTAGGTGCTC
101  ACTGAAGCTG GGGCTTATTT GAAAGGGATC TCTTCCTTTC CCTCACTCCT
151  TCCTCCTCCT CCCCACCTCT TCTTTCGCTC TGCCTCCTGG AGCGCGACAG
201  ACCCACGGCC CACCCACAGT AAATTAATTT TGACAAGGAA CTTAAGATAA
251  TGTCAAAGCG CTGACTAATC AGTGGATTGG GTTTCTGTAA GGCAGGGAGC
301  TGTGAAACAC GCCATCATGC CTAATAAAAG ACTGCCATTG CGTCTCTCTC
351  TCTCGCTCTC TTTTCACCTC ACCTGCTACT CCTGTCCGCT CCGTTTGGAG
401  ACGAAAAACC ATTACAGTCT CAAGGAGCA
```

Név: *Cba*21
GenBank Azonosító: AY169273
Méret: 523 bp

```
  1  CACGGGACGA TACTGTCACG ATACCAATTA CTGCACCATT ATCTTTGCAT
 51  CGGATTGGCT TAGTTTAATA TTCAATGCTA AAAGCATGTA ATAAAATAAA
101  AGAAACTTCT ATTTCTTAGT ATTCAGGACC CTTCTGTCAA GTTGGCAGCT
151  TGCTTTCCTC AAAAAAATAA ATAATGAATC CAAACTTACT TGTTCCACTT
201  GTCTCACTTC GTTTATTCTT CCGTGTGTGT GTGTGTCACA AGTGTTGTAC
251  AATCCCGCTG CGTTTGCTTA ACATTGGGTT ACCATGAGGT CACGTCTCCT
301  AACCACCGTG TACCAAACTG CAAACCATGA GACGTCCTGA TGAGCCACAA
351  CCTCTCGCCA CTCGGCACAC ATACAAGATG GATTGCTGTC TCGAACACAA
401  AGAGGCCTGA AACTCTACGC TGGAAATCTC CAGCGTAAGC CGAGACGTGG
451  TTTAACGGCC AATGTTTTTC TGCCATTGGC TGCCACGGAT GCCAGTCAGG
501  ACGGCTTGAG AAGGAGATGG ATC
```