



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM
SZENT ISTVÁN CAMPUS

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

IN VITRO GÉNMEGŐRZÉSI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE LÚD (ANSER ANSER DOMESTICA) FAJBAN KORAI EMBRIONÁLIS SEJTEK FELHASZNÁLÁSÁVAL.

SZTÁN NIKOLETTA

Gödöllő

2022

1

A doktori iskola

Megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

Tudományága: Állattenyésztési tudományok

Vezetője: Prof. Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, az MTA rendes tagja

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági Tanszék

Témavezető:

Dr. Várkonyi Eszter CSc.

tudományos főmunkatárs

Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ

Haszonállat-génmegőrzési Intézet

Társtémavezető:

Dr. Hidas András CSc.

tudományos főmunkatárs

Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ

Haszonállat-génmegőrzési Intézet

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
Témavezető jóváhagyása

Várkonyi Eszter CSc.

.....
Társ-témavezető jóváhagyása

Hidas András CSc.

1. TARTALOMJEGYZÉK

1.	TARTALOMJEGYZÉK	3
2.	Jelölések és rövidítések jegyzéke	6
3.	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	8
3.1.	Bevezetés.....	8
3.2.	Célkitűzések	11
4.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
4.1.	A lúdágazat helyzete hazánkban	12
4.2.	A madarak szaporodásbiológiai sajátosságai	13
4.2.1.	<i>Madarak szaporodásbiológiai sajátosságai nőivarban</i>	15
4.2.2.	<i>A madarak szaporodásbiológiai sajátosságai a hímivarban</i>	16
4.3.	Az embrionális őssejtek típusai.....	16
4.3.1.	<i>Blasztodermális sejtek (BCs) és csirke embrionális őssejtek (cESCs)</i>	16
4.3.2.	<i>Madár primordiális őscsírasejtek (cPGCs)</i>	18
4.3.3.	<i>Germinális őscsírasejtek (GGCs/gPGCs)</i>	20
4.3.4.	<i>Indukált pluripotens őssejtek (iPSCs)</i>	20
4.4.	Az embrionális őssejtek hosszútávú fenntartása	21
4.4.1.	<i>Az embrionális sejtek hosszútávú fenntartása sejtenyészetben</i>	21
4.4.2.	<i>Az embrionális sejtek mélyhűtéssel történő tárolása</i>	23
4.5.	A kiméra előállítás lehetséges módszerei.....	25
4.6.	Az embrionális sejtekkel végzett kutatások gyakorlati jelentősége	27
4.6.1.	<i>Embrionális sejtek segítségével történő génmegőrzés a veszélyeztetett madárfajok, az őshonos baromfifajták és a gazdasági szereplők számára</i>	27
4.6.2.	<i>Ősivarsejtek génszerkesztésének lehetősége, felhasználása a madaraknál</i>	28
5.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	31
5.1.	Állatkísérletek etikai vonatkozásai.....	31
5.2.	Kísérleti elrendezés	31
5.3.	A vizsgálatokban résztvevő magyar lúd fajta jellemzése.....	31

5.4. A lúd szülőpár csoportok kialakítása mikroszatellit-marker vizsgálatok alapján	32
5.5. A kísérleti lúd állományok tartástechnológiája	34
5.6. A magyar lúd embriófejlődési stádiumainak meghatározása.....	34
5.7. Az ősvarsejtek fluoreszcens immunfestése egész lúd embrióban.....	35
5.8. Lúd blasztodermális sejtszuspenzió immunfestése ősvarsejt-specifikus markerekkel ...	35
5.9. A recipiens tojások kezelése injektálás előtt	36
5.10. A donor blasztodermális sejtek kinyerése	36
5.11. Donor korai embrionális sejtek injektálása 3 napos recipiens lúdembrióba	38
5.12. Az injektált tojások inkubálása, lámpázása, az embrióelhalások idejének és lehetséges okainak vizsgálata.	42
5.13. A lehetséges kimérizmus vizsgálata mikroszatellit marker analízissel.....	42
5.14. Kontroll kísérletek.....	43
5.15. Statisztikai analízis	44
6. EREDMÉNYEK	45
6.1. Az embriók fejlődésének vizsgálata és az injektálás optimális időszakának meghatározása magyar lúdban	45
6.2. A lúd ősvarsejtek vándorlásának vizsgálata az embrióban immunfestéssel	48
6.3. Az intrakardiális injektálás 3 napos lúd embrióba és az így elérhető kiméra előállítás hatékonysága	49
6.4. Az injektálás hatása a recipiens embriók mortalitására.....	51
7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	54
7.1. Embriófejlődési vizsgálatok házilúd (<i>Anser anser domestica</i>) fajban	54
7.2. Új módszer kidolgozása a házilúd embrionális sejtek segítségével történő génmegőrzésére ivarszervi kiméra előállításával	56
7.3. Javaslatok	61
8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	62
9. ÖSSZEFOGLALÁS.....	63
10. SUMMARY	64
11. MELLÉKLETEK	65

11.1. M1. IRODALOMJEGYZÉK:	65
11.2. M2. A KISÓZÁSOS DNS IZOLÁLÁS SORÁN HASZNÁLT PUFFEREK ÖSSZETÉTELE	87
11.3. M3. A MIKROSZATELLIT MARKER ALAPJÁN TÖRTÉNŐ DONOR/RECIPIENS KIVÁLASZTÁS ÉS KIMÉRA AZONOSÍTÁS PCR REAKCIÓK PARAMÉTEREI.....	87
11.4. M4. LÚD EMBRIÓFEJLŐDÉSI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	89
12. FONTOSABB TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK.....	89
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	92

2. JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2i-SP	két, kisméretű inhibitor molekula (two small-molecule inhibitors)
ALV-J	madár leukózis vírus, „J” alcsoport (Avian leukosis virus subgroup J)
BC	blasztodermális sejt (blastodermal cell)
BMP4	csont morfogenetikus fehérjecsald tagja (bone morphogenic protein 4)
BSA	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
BRL	Buffalo patkány máj sejtvonal (Buffalo rat liver cell line)
CEF	házityúk embrionális fibroblaszt (chicken embryo fibroblast)
cESC	házityúk embrionális őssejt (chicken embryonic stem cell)
CRISPR	halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
CVH	Házityúk VASA homológ (chicken VASA homologue, DEAD-box helicase 4)
CY5	távoli vörös fluoreszcens festék
DMEM	Dulbecco módosított Eagle tápoldata (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
EGK	Eyal-Giladi és Kochav féle embrionális fejlődési stádiumok
EMA-1	embrionális egér antigén-1 (embryonic mouse antigen-1)
FBS	szarvasmarha magzati savó (fetal bovine serum)
FGF2	fibroblaszt növekedési faktor 2 (fibroblast growth factor 2)
gPGC/GGC	ivarszervi PGC, ivarszervi őscsírsejt (gonadal PGC, gonadal germ cell)
HH	Hamburger és Hamilton féle embrionális fejlődési stádiumok
IDE1	Definitív endoderma induktor-1 kis molekula (inucer of definitive endoderm 1)
IGF1	inzulinszerű növekedési faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
iPSC	indukált pluripotens őssejt (induced pluripotent stem cell)
IQR	Interkvartilis terjedelem (Interquartile range)
LIF	leukémia inhibitor faktor (leukemia inhibitory factor, LIF interleukin 6 family cytokine)

PBS	foszfát pufferes sóoldat (phosphate-buffered saline)
PFA	paraformaldehid (paraformaldehyde)
PGC	ősivarsejt, őscsírasejt, primordiális csírasejt, PG sejt (primordial germ cell)
SSEA-1	stádium-specifikus embrionális antigén-1 (stage-specific embryonic antigen-1)
TALEN	transzkripció aktivátor-szerű effektor-nukleáz (transcription activator-like effector nucleases)
TO-PRO™-3	távoli vörös fluoreszcens festék
VASA	DEAD-box helikáz 4 (DEAD-box helicase 4, DDX4)

3. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

3.1. Bevezetés

Bolygónk népessége az elmúlt évtizedekben is jelentősen növekedett. 2021-ben megközelítette a 7,8 milliárdot, míg ez a szám 2000-ben még csak 6,1 milliárd fő volt. Ez a nagyarányú népességnövekedés az emberiség növekvő terület- és élelmiszerigényére is hatással van. Az élelmiszerhiány elkerülése érdekében a mezőgazdasági termelés egyik elsődleges célja a megtermelt élelmiszer mennyiségének olyan ütemű növelése, mely lépést tart a népességnövekedés ütemével. Mivel azonban a növénytermesztésre és állattartásra használható területek nagysága behatárolt, így nem elegendő a növénytermesztésre használt területek és az állatállományok létszámának növelését célul kitűzni, sokkal inkább a termelés hatékonyságának növelését kell szem előtt tartani (*Baile, 2000*). Az állati termékelőállítás növelésére irányuló intenzív szelekció és a minél nagyobb húskihozataalt célzó keresztezési programok a baromfitenyésztésben is a génállomány eróziójához vezettek, mivel ez a stratégia nem koncentrált a génmegőrzési szempontokra (*Bessei, 1989*). A genetikai diverzitás csökkenése globális jelenség, melynek egyik sajnálatos oldala, hogy az intenzív fajták térhódításával háttérbe szorulnak az őshonos – többek között baromfi – fajok/fajták is.

A folyamat megállítása világméretű összefogást és együttműködést igényelt. Ennek tudatában dolgozta ki a biológiai sokféleségről szóló egyezményt az ENSZ („Convention on Biological Diversity”), amit 1992-ben Rio de Janeiroban a Környezet és Fejlődés Konferencián hozott nyilvánosságra. Az egyezményt 168 állam - beleértve Magyarországot is – írta alá. Az egyezményt Magyarországon az 1995. évi LXXXI. törvény hirdette ki. Az egyezményben többek között elfogadásra került az a tétel, hogy a háziállatok is hozzátartoznak a világ biológiai sokféleségéhez. Ezen felül azóta több világszervezet foglalkozott a problémával, és célul tűzte ki annak hosszútávú és hatékony megoldását (Konferencia a globális felmelegedésről, Hága, 2000; ENSZ Világcsúcs-konferencia a fenntartható fejlődésről, Johannesburg, 2002).

Magyarország a Rio de Janeiro-i egyezmény aláírása előtt is élen járt az őshonos és régen honosult háziállatfajták fenntartásában. Az erre irányuló törekvések már az 1960-as években megkezdődtek, 1971 óta pedig több nemzetközi és világkonferenciának adtunk otthont, amelyeknek a témája a géntartalékok fenntartása és megőrzése volt. Hazánkban az őshonos és veszélyeztetett baromfifajták génmegőrzési programjai és a tenyésztőszervezeti munka a Magyar Haszonállat-génmegőrző Egyesület (MGE) keretein belül zajlik (*Szalay, 2015*).

A génmegőrzésnek – melynek jelentősége haszonállataink tekintetében is egyre inkább nyilvánvaló – az értékes, ritka allélok elvesztésének és a genetikai diverzitás beszűkülésének megakadályozására több lehetséges megoldás is rendelkezésünkre áll.

Az *in situ in vivo* génmegőrzés során az adott faj/fajtat az eredeti élőhelyén, kisebb-nagyobb állományokban tartják fenn és tenyésztik, az *ex situ, in vivo* génmegőrzés keretében pedig az állatokat az eredeti élőhelyüktől eltérő területeken, farmokon, állatkertekben, nukleusz populációkban gondozzák és szaporítják. A Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK-HGI) már a 1950-es évektől kezdve megtalálhatóak az őshonos magyar baromfi és víziszárnyas fajok és fajták (*Biszkup and Beke, 1951; Báldy, 1954*), mint élő génbanki állományok. Az élő állományok fenntartása esetén azonban az állományok számos veszélynek vannak kitéve, úgymint a fertőző betegségek (pl. madárinfluenza), természeti katasztrófák, ragadozók általi pusztítás – melyek nagy része előre nem látható, és nem befolyásolható. Emiatt önmagukban az értékes populációk biztonságos hosszútávú megőrzésére ezek a módszerek nem alkalmasak. Ezért szükséges az *ex situ, in vitro* génbankok kialakítása, fenntartása is, ahol az ezen állományokból származó ritka, értékes genetikai anyagot hordozó hím- és nőivarsejteket, embriókat, embrionális sejteket/szöveteket, illetve korai ivarszervszöveteket és DNS mintákat mélyhűtött állapotban, hosszú távon képesek vagyunk megőrizni.

Madaraknál azért van nagy jelentősége az ősvarsejtek génbanki tárolásának, mert az emlősökkel ellentétben itt a nőivar rendelkezik a heterogametikus ZW, míg a hímivar a homogametikus ZZ kromoszómapárral, tehát a nőivarban jelenlévő W ivari kromoszóma genetikai anyagát, valamint a mitokondriális DNS-t csak így lehet megőrizni. Mivel a spermiumok csak a haploid (Z) genetikai anyagot tartalmazzák, ezért kizárólag a spermamélyhűtéssel és tárolással, valamint annak felengedés utáni génmegőrzési célzatú felhasználásával az eredeti genom rekonstruálásához 6-8-szoros visszakeresztezésekre van szükség (*Blesbois, 2007*).

Az 1990-es években kezdődött meg a madár-ősvarsejtek jelentőségének felismerése és az ezzel kapcsolatos kutatások (*Tajima et al., 1993; Naito et al., 1994*) publikálása, majd házityúk esetében kidolgozták sejtenyésztésben történő fenntartásuk és tenyésztésük módszerét is (*Van De Lavoie et al., 2006*). Napjainkban az ősvarsejtek kinyerhetők a madárembriók véréből, bizonyos fajok esetében (tyúk, fürj, zebrapinty, lúd) tenyésztethetők, mélyhűthetők, majd visszaültethetők egy recipiens embrióba azzal a céllal, hogy az a donor eredetű ivarsejteket termelje, így ezek a sejtek a génmegőrzési, valamint a génmódosítási célú kutatások kiváló alanyai.

Számos madárfaj esetében azonban – így a kutatásomban szereplő őshonos magyar lúd esetében – nem állt rendelkezésre az ősvarsejtek tenyésztéséhez és hosszútávú fenntartásához szükséges megfelelő tenyésztő médium.

Napjainkban ennek kidolgozására már vannak sikerrel kecsegtető kutatások. A fajspecifikus tenyésztőmédiumok kifejlesztése azonban rendkívül költség-, munkaerő-, illetve időigényes folyamat.

A lúd fajt ritkán használják kísérleti állatként, mivel szezonális szaporodású, nagytestű, természetes körülmények között víz közelségét igénylő legelő madár, amelynek tartása költség- és helyigényes. Azonban mind a kereskedelmi fajták értékes genetikai állományainak fenntartása szempontjából, mind az őshonos fajták génmegőrzése szempontjából fontosnak tartottam egy olyan, a lúd esetében alkalmazható, költséghatékony és viszonylag egyszerű módszer kidolgozását, mellyel megoldható ennek a fajnak a biztonságos génmegőrzése. Igyekeztem egy olyan komplex, két módszer ötvözésén alapuló új eljárást kidolgozni, amely megoldást nyújthat arra a problémára, hogy a lúd ősvarsejtek egyelőre még nem tenyésztethők.

3.2. Célkitűzések

A házityúk fajban az ősvarsejtek izolálása és hosszú távú fenntartása szövettanyészetben már kidolgozott (*Van de Lavoir et al. 2006; Whyte et al. 2015; Tonus et al. 2016*). Ez utat nyitott az ősvarsejtekkel történő különböző manipulációk felé néhány madárfajban; pl. a PG sejtek a recipiens embriók keringési rendszerébe visszainjektálva képesek a gonádokba vándorolni (*Yasuda et al. 1992*) és ott ivarsejteké érni (*Ono et al. 1998; Tajima et al. 1993*). Azonban a sejtvonalak fenntartásához szükséges tápoldatok fajspecifikusak, továbbá az ősvarsejtek donor embrióból való kinyerésének, tisztításának és felsokszorosításának nagy az infrastruktúra- és a képzett humánerőforrás-igénye, ami nem minden laboratóriumban áll rendelkezésre. Ezért a legtöbb baromfi és víziszárnyas fajnál áthidaló megoldás kidolgozása vált szükségessé. Sajnálatos módon a blasztodermális eredetű őssejtek nagyon korai embrióba (X. stádium) történő injektálásának kisebb a hatékonysága az ivarszervi kiméra-előállítást illetően, ezért a két módszert ötvözve elsődleges célom volt, hogy kidolgozzak egy új technikát, mely szerint blasztodermális sejtuszpenziót injektálok 3 napos lúdembrió (HH14-17) véráramába abban az időszakban, amikor az ősvarsejtek vándorlása történik az embrionális ivarszervekbe. Abból indultam ki, hogy már a korai embrionális őssejtek között is található ősvarsejtek, amelyeket a megfelelő időszakban az embrióba juttatva azok elvándorolnak a rendeltetési helyükre, így növelve az ivarszervi kimérák arányát (*Patakiné et al. 2017*).

Munkám során az alábbi célokat határoztam meg:

- Pontosn behatárolni a lúd embriófejlődésének azt az időszakát, amikor az ősvarsejtek vándorolnak az embrióban (HH14-17).
- Immunfestéssel bizonyítani, hogy a blasztodermális sejtuszpenzió valóban tartalmaz ősvarsejteket, valamint, hogy a megfelelő fejlettségű lúdembrió véráramában valóban vándorolnak a PG sejtek.
- Megvizsgálni az injektálási módszer embriófejlődésre gyakorolt káros hatásait.
- Az elhalt embriókon és a kikelt naposlibákon mikroszatellit marker analízis segítségével megállapítani, hogy a recipiens embrióban/kislibában jelen vannak-e a donor sejtek, illetve hol helyezkednek el.
- Végül pedig annak a vizsgálata, hogy a keltetés hányadik órájában végzett injektálás a leghatékonyabb a kiméra előállítás szempontjából.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. A lúdágazat helyzete hazánkban

Az *in vitro* génmegőrzési módszerek fejlesztése azoknak a tenyésztőcégeknek is érdekes lehet, amelyek értékes genetikai háttérrel rendelkező kereskedelmi lúd vonalakat tartanak fenn. Egyrészt az állategészségügyi problémák (pl. madárinfluenza) okozhatnak olyan mérvű kiesést, aminek következtében pótolhatatlan állományok veszhetnek el. Másrészt a genetikai munka során keletkezhetnek olyan törzsek, amelyek *in vivo* fenntartására nincs szükség, azonban ha a későbbiekben szükségessé válik egyes tulajdonságok visszanyerése, akkor az *in vitro* tárolt genetikai anyag erre lehetőséget biztosít. Emiatt lényeges, hogy bemutassam a lúdágazat hazai jelentőségét, helyzetét.

Magyarországon a lúdtartás-tenyésztés tradicionális ágazat, melynek múltja egészen a honfoglalásig nyúlik vissza. A 20. század elején, főként az ország déli részén megjelentek az első vágóhidak is, itt a tanyavilágban és a legelőkön sok libát tartottak. A magyar libamájat rendszeresen szállították a bécsi piacokra is. Ekkoriban a libafogyasztás még a társadalom minden rétegében általános szokás volt hazánkban, mára azonban prémiumtermékké vált, és főként Szent Márton nap (november 11.) és karácsony környékére összpontosul a kereslet. Napjainkban Magyarország Lengyelországgal együtt meghatározó szerepet játszik az európai lúd árutermelésben. A baromfiszektor a legnagyobb hazai állattenyésztési ágazatnak számít, a piaci szereplők 50-60 ezer munkavállalót foglalkoztatnak. A ludak száma 2018 végén 1,3 milliót tett ki hazánkban, a naposliba-keltetés megközelítette a 6,5 milliós egyedszámot. 2018-ban a feldolgozóüzemekben közel 22 ezer tonna mennyiségben állítottak elő vágottliba-terméket, a hízottliba-felvásárlás növekedett, az előállított hízott libamáj mennyisége mintegy 60%-kal nőtt. Az előállított 1422 tonna libamájából körülbelül 1000 tonna külpiacokon talált vevőre. A 2010 és 2018 közötti időszakban a baromfivágások 46, ezen belül a libavágások 59%-kal bővültek vágósúlyban (NAK – Nemzeti Agrárgazdasági Kamara, 2019). A Baromfi Termék Tanács 2019 első háromnegyed évére vonatkozó ágazati helyzetjelentése szerint (Csorbai et al. 2019) aggasztó helyzet alakult ki a víziszárnyas termékpályán, ahol a madárinfluenza miatti áruhiány kezdetben ugyan áremelkedést hozott, ám ez együtt járt a csökkenő fogyasztással, és az áruházláncok esetében csökkenő polcfelületekkel is. A 2019-es év végén kiobbant koronavírus-járvány, illetve a madárinfluenza járvány ezen ágazat esetében is jelentős visszaesést okozott. A vendéglátó szektor kiesésével az élelmiszerpiac 25%-a tűnt el. A baromfi ágazaton belül a liba- és kacsamáj-termékpálya a leginkább érintett, ahol a kereslet csökkenése a Covid-19 járványnak, a kínálat csökkenése pedig a madárinfluenza-járványnak tudható be elsősorban.

A NAIK Agrárgazdasági Kutatóintézet adatai szerint 2020 első fél évében 47,5%-kal kevesebb libát vágtak az egy évvel korábbinál. (*Agroinform, 2020*). 2020 első háromnegyed évében 28%-kal csökkent a németországi libahúsimport 2019-hez képest, a belföldi vágási mennyiségek pedig 3,9%-kal maradtak el a korábbi évihez képest (*MTI, 2020*).

Bár jól látható, hogy az elmúlt években jelentős visszaesés volt tapasztalható a lúdágazat vonatkozásában is, hazánk jelentős piaci szereplő Európán belül, így ez továbbra is jelentős szegmense a hazai mezőgazdaságnak, állattenyésztésnek.

4.2. A madarak szaporodásbiológiai sajátosságai

Mivel dolgozatom témája a magyar lúd (*Anser anser domestica*) embrionális sejtek vizsgálata és a segítségükkel történő génmegőrzés lehetőségeinek feltárása, fontosnak tartom bemutatni a madarak emlősökétől eltérő szaporodásbiológiai sajátosságait.

Az egyik alapvető sajátosság, hogy madarakban a hímivar a homogametikus (ZZ), a nőivar pedig heterogametikus (ZW). Mivel a tojás mélyhűtött tárolása a nagy mennyiségű szikanyag és fehérje miatt nem lehetséges, így a spermamélyhűtés és hosszú távú tárolás mellett a W kromoszóma diverzitásának és a mitokondriális DNS genetikai anyagának megőrzése jelen ismereteink szerint csak az embrionális őssejtek hosszútávú, mélyhűtve tárolásával és recipiens állatokba történő visszaültetésével lehetséges.

Jelenleg a madarak ivari determinációjának két elmélete ismert; a „Z kromoszóma dózis elmélet”, illetve a „domináns W kromoszóma hipotézis”, melyek nem feltétlenül zárják ki egymást. (*Ellegren 2000; Smith and Sinclair 2004; Ellegren et al. 2007*) Az egyik elmélet a Z kromoszómák számát tekinti a nemet meghatározó kulcsfontosságú tényezőnek, míg a másik hipotézis szerint a petefészkek növekedését elősegítő, illetve a herék fejlődését elnyomó (még nem azonosított) kulcsgén a meghatározó, amely a W kromoszómán található. Nemi kromoszóma aneuploid (túl kevés illetve túl sok nemi kromoszómát hordozó) madarak vizsgálatainak eredményeképpen (*Clinton, 1998; Lin et al. 1995; Thorne, 1995; Thorne et al. 1997*) arra jutottak a kutatók, hogy a Z dózis jelentősebb szerepet játszik a madarak ivarának kialakulásában, de a W kromoszómának is lehet valamilyen mértékű befolyása a folyamatra. *Arlt et al. 2004-es*, nádirigókon (*Acrocephalus arundinaceus*) végzett vizsgálatában viszont leírt egy szaporodóképes nőtényt, mely Z kromoszóma mikroszatellit-analízis alapján 2A=ZZW nemi kromoszómát tartalmazó egyednek bizonyult, és bár a kariotipizálást a W kromoszóma jelenlétének bizonyítására nem végezték el, ezek az adatok a „domináns W” hipotézist támasztják alá a „Z dózissal” szemben. 2010-ben *Zhao és munkatársai (2010)* a Roslin Intézetből három igen ritka, de a természetben is előforduló gynandromorf házityúkról mutattak be részletes tanulmányt. Ezek az állatok laterális nemi kimérák, testük egyik oldala hímivarú, míg a másik nőivarú. *Zhao és*

munkatársai megvizsgálták a nemi kromoszómák összetételét az állatok két (másodlagos nemi jellegeiben is jelentős eltérést mutató) oldalán, annak reményében, hogy megtalálják azt a nemi kromoszóma aneuploidiát, mely eldöntheti a „Z-W kromoszóma” -vitát. A hím oldalon lévő sejtek és a here azonban túlnyomórészt ZZ kromoszómát tartalmazott, a női oldalon lévő sejtek és a petefészek ZW kromoszómát, míg az ovotestisben (heréből és petefészekből álló nemi mirigy) ZZ és ZW kromoszómákat tartalmazó sejteket is találtak. Ennek tükrében a gyanadromorf egyedek nem segítettek megoldani a kérdést, hogy melyik nemi kromoszóma a döntő a madarak ivarának kialakításában. Azonban ez a tanulmány feltárja a nemek kialakulásának egy másik fontos aspektusát, miszerint a nem kialakulása sejt-autonóm folyamat a szövetekben test szerű, amelyet nem kizárólag hormonális jelátvitel vezérel. *Zhao és munkatársai* olyan vizsgálatokat is végeztek, melyben csirke embrionális gonádokba ZZ és ZW ősvarsejtek keverékét injektáltak, és arra a következtetésre jutottak, hogy mivel a női (ZW) ősvarsejtek nem integrálódtak a hím (ZZ) gonádba, és fordítva, ez ismét azt támasztja alá, hogy a sejtek autonóm módon „tudják” a nemüket, és meg is tartják azt (*Zhao et al. 2010*). A szerzők azt is feltételezték továbbá, hogy a Z kromoszómához kapcsolt gének nagyobb dózisa a ZZ sejtekben hím jelleget eredményez ezekben. Ez a hipotézis abból a megállapításból fakad, hogy a madarakban nincs kromoszóma kiterjedésű Z inaktiváció, amint az nőstény emlősöknél az X kromoszómánál előfordul (dóziskompensáció), hogy kiegyenlítsék az X-hez kapcsolódó gének adagját a nemek között (*Kuroda et al. 2001; Melamed and Arnold 2007*). Noha egyes gének dózis-kompensáltak, a hím madaraknak (két Z kromoszómával) átlagosan kétszerese a Z-hez kapcsolódó génexpresszió szintje a nőstényekhez képest (csak egy Z-vel rendelkeznek) (*Ellegren et al. 2007; Itoh et al. 2007; McQueen and Clinton 2009; Zhang et al. 2010*). Bár a madarak embrióiban az ivar az embrionális fejlődés korai szakaszában kialakulhat, ezeket az információkat át kell adni magának az ivarmirigynek a „genetikai kapcsolójára”, amely aztán aktiválja a herék vagy petefészek fejlődését. Számos bizonyíték utal arra, hogy ez a „kapcsoló” a Z kromoszómán található DMRT1 (Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor, # 1) gén. A csirke embriókban a DMRT1-gén mindkét nem urogenitális rendszerében mutat expressziót, de erősebben expresszál a hímek esetében (*Itoh et al. 2007; Arnold et al. 2008*). A DMRT1 gén a „knockout” (adott gén mesterséges kikapcsolása) kísérletek (*Smith et al. 2009*) alapján szükséges a herék fejlődéséhez, de nem valószínű, hogy ez a gén a legfontosabb nemet meghatározó „kapcsoló” más szövetekben vagy az embriók egészében, mivel a sejtek - úgy tűnik - ismerik a nemüket már az ivarmirigyek kialakulása előtt (*Zhao et al. 2010*). Ezért még mindig számos kérdés merül fel a madarak nemének kialakulása körül, és a kép korántsem teljes. A gonádokon kívüli sejt-autonóm ivardeterminációs „kapcsoló” természete, jellege még napjainkban is meghatározatlan.

Nem tudni, hogy vajon több Z kromoszómához kapcsolt gén, vagy a különböző szövetekben található más gének, vagy egy még nem definiált W-hez kötött gén vezérli-e?

Ezen kívül a jelenlegi ismereteink szerint az ösztrogének is kulcsszerepet játszanak a madarak ivardeterminációjában azáltal, hogy az embrionális fejlődés első három napja alatt és a későbbiekben is, befolyásolják a főbb ivardeterminációval kapcsolatos gének expresszióját (*Smirnov and Trukhina, 2019*).

4.2.1. Madarak szaporodásbiológiai sajátosságai nőivarban

Nőivarú madarak esetében az embrionális fejlődés utolsó harmadában, illetve a kikelést követő néhány napban a jobb oldali petefészek néhány kivételtől eltekintve (kivi (*Kinsky, 1971*), egyes sólyom-és héjafélék, sasok, keselyűk (*Jacob and Bakst, 2007*)) fokozatosan visszafejlődik, így az ivarérett nőivarú madarakban csak a bal oldali petefészek, valamint petevezető funkcionál.

A madarak petevezetőjének másik különleges funkciója azok spermiumtároló képessége, ami az állatvilágban nem egyedülálló, hiszen megtalálható számos gerinces és gerinctelen állatban, de a madárvilágban általánosan jellemző. A spermiumtároló tubulusok megléte miatt - az emlősöknél általánosan a párzást, illetve a mesterséges termékenyítést követő viszonylag rövid idő (24-72 óra) elteltével bekövetkező megtermékenyüléssel szemben – a madarak esetében akár 10-40 nap is eltelhet a párzás és a gaméták egyesülése között (*Péczely, 2013*). Madarakban az elsődleges spermiumtároló tubulusok az uterovaginális szűkületben, míg a másodlagosak a petevezető infundibuláris szakaszában találhatóak. Párzáskor a spermiumok a petevezető hüvelyi szakaszának alsó részébe jutnak, ahonnan nagy részük a hüvelyben zajló - ma még részleteiben nem tisztázott módon - szigorú szelekciós folyamatok következtében a kloákán keresztül kiürül, így csak az intakt, funkcionálisan ép spermiumok tárolódnak, ami a párzáskor bejutó spermiumok (fajtól függően) mindössze 1-2%-át teszi ki (*Bakst et al. 1994*). A ki nem ürült spermiumok az uterovaginális szűkületben található elsődleges spermiumtároló tubulusokban raktározódnak. A raktározó tubulusok számában és méretében eltérések vannak az egyes fajok között, pulykában 30.000 tubulus található, míg házityúkban ezek száma kb. 5.000 (*Bakst et al. 2010*). A tojók spermiumtároló képességét befolyásolhatja a fajlagos méret (*Birkhead and Moller, 1992*), valamint az életkor is (*Brillard, 1993*).

4.2.2. A madarak szaporodásbiológiai sajátosságai a hímivarban

Az emlősökhöz képest számos eltérés fedezhető fel a madarak szaporodásbiológiai sajátosságaiban a hímivar esetében is. Fontos megemlíteni a spermiumok emlősökétől eltérő morfológiáját, amely hasonlóságot mutat a hüllőkével, mivel a nyaki rész nem található meg, a fej és a középdarab viszonylag egyszerűen kapcsolódik (Péczely, 2013).

A spermatogenezis folyamata a madarakban 10 stádiumból, míg emlősök esetében 14 stádiumból áll (Aire and Ozegbe, 2007) és a folyamat jóval kevesebb időt vesz igénybe (kérődzőknél 49 nap, kakasnál 12 nap (Wolfné Táskai, 2000)).

A madarak heréi a hasüregben találhatóak, ezeket nem tagolják sövények lebenyekre, az állományukban található kanyarulatot csatornácskák az emlősökével szemben nem vakon végződnek, hanem csőhálózatot alkotnak. A spermiumtárolás és a maturáció szerepét itt nem a mellékhere, hanem az ondóvezető látja el (Péczely, 2013), melyben a heréből kikerülő spermiumok 90%-a raktározódik, míg a mellékherében csak a fennmaradó 10%.

Emlősökhöz viszonyítva fontos eltérés továbbá az érett spermiumok tárolási ideje, ami patkányok esetében átlagosan 9 nap, japán fűrjénél pedig mindössze 1-2 nap (Clulow and Jones, 1982). Bár ez a folyamat nem teljesen tisztázott, annyi bizonyos, hogy a madarak spermiumainak nincs szüksége az emlősökéhez hasonló kapacitációra (Olsen and Neher, 1948), és az akroszóma-reakció is gyorsabb.

4.3. Az embrionális őssejtek típusai

4.3.1. Blasztodermális sejtek (BCs) és csirke embrionális őssejtek (cESCs)

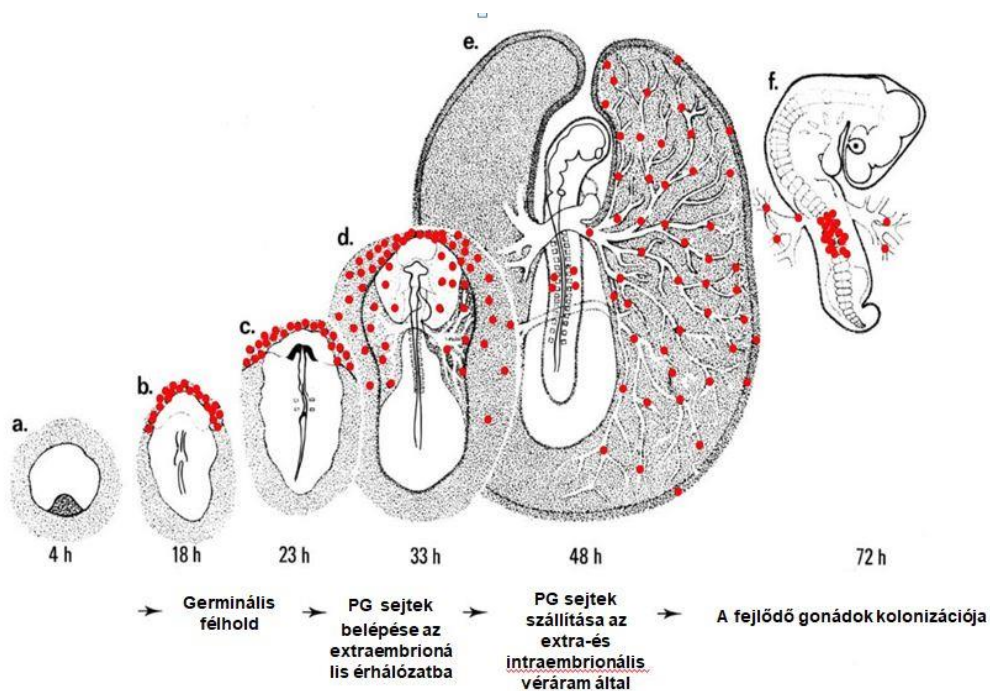
A gerincteleneken (tengeri süni) és a gerinceseken (göte) végzett úttörő munkák már a 19. század utolsó évtizedében bebizonyították, hogy totipotens és pluripotens sejtek léteznek a korai embriókban. Driesch (1891) bebizonyította, hogy a kis tengeri süni blasztodermája elfelezve is fejlődésnek indul, és képes két független állatot létrehozni, az extraembrionális szövetekkel együtt, amelyek mérete azonban kisebb lesz, mint az eredeti állaté. Ez a jelenség blasztomer totipotencia néven ismert. Spemann 1903-ban hasonló sikereket ért el kétsejtes stádiumban vett göte-blasztomerekkel, és bebizonyította, hogy a göte lárvája két egyenlő részre osztható 4, 8 vagy 16 blasztomer mellett, és két teljes embriót képes kialakítani. Ebben a szakaszban a blasztomereket pluripotensnek tekintik, vagyis képesek részt venni a különböző embrionális szövetek fejlődésében, de nem képesek az extraembrionális szövetek létrehozására. Madarak esetében a tojás megtojása csak jóval a megtermékenyítés után következik be (tyúk fajban 20-23 órával).

A korai embriófejlődést, melynek jelentős része a petevezetőben zajlik, római számokkal jelölt 14 szakaszra osztották *Eyal-Giladi & Kochav (1976)* munkássága alapján. A megtermékenyített petesejt gyors osztódásokon megy keresztül a megtojásig, amely EG&K X. stádiumban történik, és ahol a tojás 20 - 60 000 sejtet tartalmaz, amelyeket blasztodermális sejteknek nevezünk. Ez az EG&K X. stádiumban lévő embrió morfológiáját tekintve felosztható *area opacára*, mely a perifériás részen helyezkedik el, valamint *area pellucidára*, ami az embrió központi része. Az egész embrió, továbbá az extraembrionális szövetek egy része az epiblasztból alakul ki, melyet a sárgájától a szubgerminális üreg választ el. A másodlagos hipoblaszt az epiblasztról történő delaminációval jön létre, és a hipoblaszt sejtek direkt kapcsolatban vannak a sárgájával. Inkubálás után az epiblaszt sejtek hozzák létre a primitív csíkot, mely a jövőbeni embrió tengelye. A megtojást követő embriófejlődést *Hamburger és Hamilton (1951)* munkája alapján tyúk fajban 46 arab számmal jelölt fejlődési stádiumra oszthatjuk. *Spratt és Haas (1961)* bebizonyították, hogy a blasztodermális sejtek pluripotensek; egy blasztoderma négy egyenlő részre darabolásával, melyek mindegyike képes volt normál embriót létrehozni. Továbbá *Marzullo 1970*-ben kiadott tanulmányában leírta, hogy a recipiens embrióba injektált donor eredetű blasztodermális sejtek képesek kolonizálni azt. A frissen megtojt, inkubálatlan tojásokból kinyert blasztodermális sejtekkel tollszín alapján 239 esetből 3 kiméra állatot kapott, azonban kikelt, életképes egyed nem. 1990-ben *Petitte és munkatársai* módosították a kiméra-előállítás metodikáján, elsősorban a blasztodermális sejtek szétválasztásával. X. stádiumból származó blasztodermális sejtek alkalmazásával élő kimérákat kaptak, köztük ivarszervi kimérákat is, melyek képesek voltak továbbadni utódaiknak a donor sejtek genotípusát. Ezzel bizonyítást nyert az EG&K X. stádiumú blasztodermális sejtek csírvonal alkotó képessége. A recipiens embriók enyhe besugárzása megnövelte a kimérák létrejöttének esélyét, testi kimérák esetében 15-20%-kal, míg ivarszervi kimérák esetében 3%-kal (*Carsience et al. 1993*). A blasztodermális sejtek másik felhasználási lehetősége, hogy *in vitro* tenyésztésükkel pluripotens embrionális sejt vonalakat hoznak létre (ESC), melyek emlősök esetében a blasztociszta ICM (inner cell mass) régiójából származnak (*Evans and Kaufman, 1981; Thomson et al. 1998*). A blasztodermális sejteket leukémia inhibitor faktort (LIF), őssejt faktort, inzulin növekedési faktor 1-et (IGF 1), és egyéb faktorokat tartalmazó médiumban tenyésztették (*Pain et al. 1996, Petitte et al. 2004*) - melyeket az egér ESC sejt vonalak létrehozásakor már használtak korábban - a csirke embrionális sejt vonalak (cESC) létrehozásához. A cESC sejt vonalak számos őssejt markert expresszálnak, úgymint a stádium-specifikus embrionális antigén 1-et (SSEA-1), alkalikus foszfatázt, és az epitélium membrán antigén 1-et (EMA-1) (*Park et al. 2006, Van De Lavoie et al. 2006b*).

Három csírarétegre differenciálódhatnak és embrionális testek létrehozására is képesek a LIF eltávolításával a tápközegből, valamint kimérák létrehozására képesek recipiens embrióba ültetve, mindezekkel igazolva pluripotens mivoltukat.

4.3.2. Madár primordiális őscsírasejtek (cPGCs)

A madár PG sejteket először *Waldeyer* írta le 1870-ben. Ezek a sejtek a gametogenezis útján továbbítják a genetikai információt a következő generációnak. Ez a fejlődés során létrejövő első csírasejt populáció, mely sejtekből a spermatogóniumok és az oociták fejlődnek később. A madár PGC-k egyik legfontosabb biológiai jellemzője, hogy a germinális félholdból a vérkeringésbe jutva a véráramban vándorolnak a fejlődő gonádokhoz, hogy azokat kolonizálják (1. ábra).



1. Ábra: A PG sejtek vándorlása a fejlődő házityúk embrióban:

- a: Azonosítható PG sejtek még nincsenek jelen a primitív csík kialakulását megelőzően
 - b, c: csírasejtek felhalmozódása a germinális félhold területén
 - d: PGC-k bejutása a vérszigetekre
 - e: PG sejtek keringése az embrionális érhalózatban
 - f: a fejlődő ivarmirigyek kolonizációja
- (A feltüntetett óraszámok az inkubációs időt jelzik)
Nieuwkoop és Sutasurya nyomán (1979) átdolgozva

Ezen tulajdonságuk teszi lehetővé, hogy a megfelelő stádiumban (házityúk fajban HH14-17) továbbtenyésztés, hosszú távú tárolás, illetve kiméra egyedek létrehozása céljából kinyerhessük őket a donor egyedek véráramából.

Nőivarban az embriófejlődés során ezek a sejtek meiózisba lépnek, majd a meiózis I. fázisában leáll a fejlődésük, míg a hímivarban a mitózis folyamán következnek be a leállítás, és a sejtek csak a kikelés után lépnek be a meiózisba. Házityúk esetében az ivarszervek differenciálódása az embriófejlődés 6. napján megtörténik, de nőivarban csak viszonylag későn, a 15,5. napon lépnek a csírasejtek a meiózisba. A házityúk ivarszerveinek fejlődése során a retinsav szabályozza a meiózisba lépést a retinaldehid-dehidrogenáz 2, egy fő retinsav szintetizáló enzim és a citokróm P450 26. család, a B alcsoport 1. tagja, egy fő retinsav bontó enzim expressziója révén. A madár PGC-k másik fő biológiai tulajdonsága, hogy hosszú távon *in vitro* szaporíthatóak, és ez a technika hasznos a proliferációs mechanizmusok vizsgálatához. A házityúk PGC-k proliferációjában szerepet játszó fő tényező a fibroblaszt növekedési faktor 2 (FGF2), amely aktiválja a MEK/ERK jelátvitelt, és ezáltal elősegíti a sejtciklust és az apoptózist. Ezenkívül a PI3K/Akt jelátvitel aktiválása elengedhetetlen a házityúk PGC-k szaporodásához és túléléséhez (Tagami *et al.* 2017). Sok gerinces és gerinctelen állatban a csírasejtek a fejlődés korai szakaszában egyértelműen elkülönülnek a szomatikus sejtípusoktól. Ezekben a szervezetekben a csírasejtek gyakran nem az ivarmirigyekben keletkeznek, hanem máshonnan származnak, és később vándorolnak a fejlődő ivarszervekhez. A csírasejtek autonóm módon is szerezhetnek specifikációt, ez az úgynevezett „preformációs” modell, vagy indukció útján, mely az úgynevezett „epigenézis” modell. A preformációs modellben a petesejt citoplazmájának bizonyos régiói anyai öröklődésű determinánsokat tartalmaznak, amelyek a sejteket PGC-ként határozzák meg a megtermékenyítés előtt vagy közvetlenül azt követően (Eddy 1975; Illmensee and Mahowald 1974; Olsen *et al.* 1997; Venkatarama *et al.* 2010). Az ilyen determinánsokat tartalmazó citoplazmatikus régiót gyakran csíraplazmának nevezik. Korai kutatások szerint a csírasejtek a hipoblasztból származnak (Swift, 1914), ám 1981-ben Eyal-Giladi és munkatársai bebizonyították, hogy a madár csírasejtek epiblaszt eredetűek. Azóta úgy gondolják, hogy a cPGC-k fokozatos epigenetikai folyamat révén specifikálódnak a blasztodermális stádiumok körül (Karagenç *et al.* 1996). A *Drosophila* csirkehomológ vasa expressziós mintázatára, a csíravonalra specifikus RNS-kötő fehérjére vonatkozó vizsgálatok azonban kimutatták, hogy a csirke VASA fehérje a petesejtek mitokondriális felhőjének részét képezi, és az osztódási barázdákban helyezkedik el az osztódási szakaszok során (Tsunekawa *et al.* 2000). Ezek alapján az eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy a preformációs modell lehet az a mechanizmus, amely az őssejtek determinációjáért felelős madarak esetében, habár ennek bizonyítására további funkcionális vizsgálatok szükségesek.

4.3.3. Germinális őscsírasejtek (GGCs/gPGCs)

Amint a madár PG sejtek letelepednek a fejlődő ivarlécek területén, az embrionális ivarszerv méretének növekedésével számuk jelentősen megnő. Az ivarszerveket kolonizáló PG sejteket gonadális PG sejteknek (gPGCs), vagy gonadális őscsírasejteknek (GGCs) nevezzük. Házityúk fajban (és általánosságban egyéb madárfajokban) a hím csírasejtek nem szaporodnak aktívan a gonádok nemi differenciálódásának kezdetétől (*Mendez et al. 2005*), míg a nőivarú csírasejtek már a HH35. stádium elejétől (inkubáció 9. napja) jelentős szaporodásnak indulnak (*Hughes 1963*). Nőivarban a bal oldali gonád kérgében a csírasejtek száma becslések szerint huszonötszörösére nő a HH35. – 43. szakaszok között (9 – 17 napos inkubáció), míg a jobb oldali gonádban, ahol a kéreg gyengén fejlett, bizonyos mértékig elszaporodnak ugyan, de a kikelésig apoptózison mennek keresztül. A meiózis nőivarban csak az embrionális fejlődés viszonylag késői (HH41. stádium – 15,5 nap inkubáció) szakaszában indul el. Ezen sejtek felhasználásának kiméra létrehozáshoz jelentős előnye a PG sejtekkel szemben, hogy *Nakajima és munkatársai 2011-es* munkája nyomán egy nagyon egyszerű, gyors módszerrel kinyerhetők a donor gonádjaiból Ca- és Mg mentes PBS használatával inkubálás mellett, és így viszonylag nagy mennyiségű, tiszta sejtállományt kapunk. E módszer alkalmazásának hátránya azonban, hogy míg a HH14-17 fejlődési stádiumban a donor embrió véráramából bonyolultabb módszerrel kinyerhető PG sejtek izolálását követően a keltetőbe visszahelyezve a tojást, az állat tovább fejlődhet, és végül kikelhet (*Nakamura et al. 2010a*), addig a GG sejtek kinyerése a gonádok eltávolítása miatt elkerülhetetlenül a donor egyed pusztulásával jár, ami a ritka, veszélyeztetett fajok/fajták esetében nem megfelelő megoldás.

4.3.4. Indukált pluripotens őssejtek (iPSCs)

2006-ban *Takahashi és Yamanaka* retrovírus vektorok használatával egér fibroblaszt sejtekbe transzfektálva négy faktort: az Oct4-et, a Sox2-t, a Klf4-et és a c-Myc-et (OSKM) az embrionális őssejtekhez hasonló (ESC) pluripotens őssejteket hozott létre, melyeket indukált pluripotens őssejteknek neveztek el (iPSCs). Amennyiben a szomatikus sejtekből származó iPSC sejtek tovább indukálhatók lennének PG sejtekké, az a jövőben új lehetőségeket nyithatna meg többek között a madarak esetében is (PG sejtek létrehozása a donor feláldozása nélkül). Az ezirányú kutatások azonban madárfajok esetében eddig viszonylag ritkának mondhatók. 2012-ben *Lu és munkatársai (2012)* alkalmaztak először Nanog, Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, valamint Lin28 (OSKMNL) túlexpresszált lentivírus vektorokat fűrből származó szomatikus sejtek iPSC sejtekké történő átprogramozásához.

Zhao 2019-ben bebizonyította, hogy a csirke embrionális fibroblasztok (CEF) sikeresen átprogramozhatók iPS sejtekké Oct4, Sox2, Nanog és Lin28 (OSNL) faktorok segítségével, indukciós stratégiával. A szomatikus átprogramozás folyamatát számos tényező szabályozza. *Silva* eredetileg egy sejtfúziós vizsgálaton keresztül fedezte fel (*Silva et al 2006.*), hogy a pluripotens gének újraaktiválása a kulcsfontosságú tényező az újraprogramozáshoz. Az Oct4 (*Rosner et al. 1990*), a Sox2 (*Rodda et al. 2005*), a c-Myc (*Dalla-Favera et al. 1982*), a Klf4 (*Li et al. 2005*), a Nanog (*Chambers et al. 2003*) és a Lin28 (*Richards et al. 2004*) mind kritikus szabályozók a pluripotencia és az önmegújító tulajdonságok fenntartásához a pluripotens őssejtekben. *Yuan és munkatársai* 2021-es tanulmányukban arra a következtetésre jutottak, hogy az OSNL indukciós stratégia segítségével iPS sejtekké programozott csirke embrionális fibroblaszt sejtek esetében az átprogramozási folyamaton keresztül az exogén alap pluripotencia faktorok aktiválták a glikolízist, továbbá az endogén pluripotencia gén-hálózatot az iPSC képződés elősegítése érdekében. Továbbá „glikolitikus aktivátor” 2i-SP-t (two small-molecule inhibitors) alkalmaztak (TGF- β és MEK-ERK inhibitorokat) az indukciós rendszer optimalizálására házityúk fajban, melynek alkalmazásával az iPSC előállítás hatékonyságát a korábbi 1,59%-ról 11,47%-ra növelték. Az iPS sejteket hosszú ideig fenntartották *in vitro* tenyészetekben, melyek így ideális kiindulási lehetnek bizonyos transzgénikus technológiáknak. A későbbiekben várhatóan ezek a sejtvonalak széleskörű alkalmazási lehetőségeket rejtenek magukban, különösen azon fajok esetében, ahol eddig nem hoztak létre ES sejtvonalakat. Baromfi esetében az iPS sejtek felhasználhatóak PGC-k előállítására (*Hayashi and Shaitou, 2012*), továbbá transzgénikus madarak létrehozására, illetve a ritka madárfajok/fajták megőrzésére.

4.4. Az embrionális őssejtek hosszútávú fenntartása

4.4.1. Az embrionális sejtek hosszútávú fenntartása sejtenyészetben

Pain és munkatársai 1996-ban házityúk- és fűj embriók felhasználásával embrionális eredetű (ES) sejtvonalakat hoztak létre, melyek esetében arra a következtetésre jutottak, hogy hosszabb távú fenntartásuk kizárólag LIF (leukémia inhibitor faktor) tartalmú tápoldatban lehetséges, enélkül ugyanis különböző fejlődési irányokba differenciálódnak. Ezek a sejtek azonban a hosszútávú tenyésztés során elveszítik azt a képességüket, hogy ivarsejtté differenciálódjanak, melyre napjainkig két lehetséges magyarázatot vetettek fel a kutatók. Az egyik magyarázat szerint a tenyészetben való fenntartás során maguk az ES sejtek veszítik el a csíravonal irányú differenciálódás képességét.

A másik lehetséges magyarázat az, hogy az EG&K X. stádiumban az ősvarsejtek még az epiblaszt területén találhatóak, így a frissen izolált sejtszuspenziót a recipiensbe injektálva létrehozható ivarszervi kiméra utód (*Lavial and Pain, 2010*).

Azonban a médium, amelyet ezeknek a sejteknek a fenntartására optimalizáltak, nem megfelelő a PGC sejtek fennmaradásához, tehát hosszabb távon a tenyészetekben csak a blasztodermális eredetű sejtek (ESC) maradnak életben, az ősvarsejtek kisselektálódnak. Az ES sejtek pedig eredendően nem képesek csíravonal kialakítására (*Lavial and Pain, 2010*). Tehát a blasztodermából nyert sejtszuspenziót a tenyésztés viszonylag korai stádiumában le kell fagyasztani, hogy később ivarszervi kimérákat kaphassunk a felhasználásukkal.

Van de Lavoir és munkatársai 2006-ban sikeresen fejlesztettek ki egy olyan tenyésztőmédiumot, mely alkalmasnak bizonyult házityúk fajban egyetlen donortól származó, elsősorban hím PG sejtek felszaporítására és hosszútávú fenntartására. Buffalo rat liver (BRL) sejteket használtak táplálósejtnak, és a médium szarvasmarha magzati savót (fetal bovine serum, FBS), tyúk szérumot és humán FGF2-t tartalmazott. A hím eredetű PG sejtek gyorsabban nőttek, valamint a nőivarú PG sejtvonalak a hosszútávú fenntartás során gyakran elpusztultak, illetve 77 nap után már nem voltak alkalmasak ivarsejtek kialakítására. (*Whyte et al. 2015; Nakamura, 2016*) Ezt követően számos kutatócsoport kezdett kutatásokba, melyek eredményeképpen először táplálósejteket is tartalmazó médiumokat fejlesztettek, majd a molekuláris jelátviteli utak feltérképezésével a PG sejtek számára egyre optimálisabb osztódási és fenntartási közeget biztosító tápoldatokat hoztak létre. *Choi és munkatársai 2010*-ben táplálóközeg nélküli tenyésztési körülmények között tartottak fenn sikeresen PG sejtvonalkat differenciálódás, illetve dedifferenciálódás nélkül, továbbá alap fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) tartalmú médiumot használtak, ami vizsgálataik alapján kulcsfontosságú szabályozó elem a PG sejtek proliferációja és túlélése szempontjából. *Macdonald kutatócsoportja 2010*-ben a fentebb leírt médiumot használta néhány változtatással, amely 50% BRL (buffalo rat liver) kondicionált médiumot tartalmazott KO-DMEM-ben, 10% szarvasmarha-szérumot (FBS), 2,5% csirke szérumot, valamint humán bFGF és humán- valamint egér SCF (stem cell factor-őssejt faktor) hozzáadott növekedési faktorról és anélkül is elvégezték a kísérletet. Megállapították, hogy a bFGF hozzáadása a táptalajhoz növelte a PGC-kultúrák létrejöttének gyakoriságát, az SCF hozzáadása azonban, bFGF-fel vagy anélkül, nem váltott ki ilyen hatást. *Miyahara és munkatársai 2014-es* kutatásukban szintén a korábbiakhoz hasonló alap médiumot használtak, amely BRL sejtekkel kondicionált KnockOut DMEM, 7,5% FBS-sel kiegészítve, 2,5% csirkeszérummal (*Sigma*), 5 ng/ml humán alap fibroblaszt növekedési faktorról (bFGF), 4 ng/ml humán őssejt faktorról (SCF), és 2 ng/ml humán leukémia inhibitor faktorról (LIF).

Miyahara és munkatársai 2016-os tanulmányukban a csirke őssejt faktor (chSCF) hatását vizsgálták a házityúk PGC-k *in vitro* proliferációjára. Két feeder sejtvonalat hoztak létre (buffalo patkánymájsejtek; BRL sejtek), amelyek stabilan expresszálják a chSCF feltételezett szekretált formáját (chSCF1-BRL) és a membránhoz kötött formáját (chSCF2-BRL). A tenyésztett PGC vonalakat chSCF1 vagy chSCF2-BRL feeder sejteken inkubálták fibroblaszt növekedési faktor 2-vel (FGF2), és megvizsgálták az egyes chSCF izoformák PG sejtvonalak növekedésére gyakorolt hatásait. A PGC-k *in vitro* proliferációs rátája chSCF2-BRL sejteken tenyésztve 20 napos tenyésztés után több mint háromszor nagyobb volt, mint a chSCF1-BRL sejteken tenyésztett PG sejteké, és több mint ötször magasabb, mint a normál BRL sejteken tenyésztett PG sejteké. A PGC-proliferáció gyorsulása chSCF2-BRL-en azonban nem volt megfigyelhető FGF2 nélkül, ami arra utal, hogy a chSCF2 az FGF2 proliferációs kofaktoraként működik. *Whyte és munkatársai nyomán 2015-ben* született újabb jelentős áttörés a témában, amikor kidolgoztak egy olyan táplálósejt- és szérumentes tápoldatot, melynek standardizálási, minőségbiztosítási jelentősége van. Ugyanis a tyúk szérum illetve a táplálósejt-összetétele, minősége eltérő lehet, illetve egy egyszerűbb és költséghatékonyabb médium jobban alkalmazható széles körben. Továbbá ezek a korábbiakkal ellentétben megfelelőek a nőivarú PG sejtek hosszútávú szaporítására és fenntartására is, eltérő ozmolaritásuk és CaCl koncentrációjuk okán, amely jobban megfelel a nőivarú PG sejtek hosszútávú fenntartásához.

A madár PG sejtek sejtenyésztésben történő hosszútávú fenntartásának egyik nehézsége, hogy ezeknek a sejteknek fajoként igen eltérő igényeik vannak, tehát a házityúk faj sejtjeinek megfelelő médiumban más faj egyedeinek PG sejtjei nem maradnak életben. Minden faj esetében egyedi médium létrehozására van szükség, melyhez az adott faj sejtjeinek jelátviteli útvonalaik feltérképezésére van szükség az optimális tenyésztőmédium létrehozásához. A tyúk fajon túl napjainkra PG sejtek hosszútávú, hatékony fenntartására irányuló kutatások folynak többek között fürj (*Yakhkeshi et al. 2018*), zebrapinty (*Gessara et al. 2020*), és már lúd (*Doddamani 2019*) esetében is.

4.4.2. Az embrionális sejtek mélyhűtéssel történő tárolása

Elsőként *Naito és munkatársai (1992)* számoltak be blasztodermális sejtek sikeres mélyhűtéséről és későbbi felhasználásáról japán fürjben. A sejteket fagyasztócsövekbe helyezve, krioprotektáns (10% DMSO) hozzáadásával -80°C-ig 3 órán keresztül fagyasztóládában hűtötték 1°C/perc hűtési sebességgel, majd ezt követően folyékony nitrogénbe helyezték. 1-7 nap elteltével a mintákat 37°C-os vízfürdőben felolvasztották a további felhasználáshoz. Házityúk fajban *Petitte és munkatársai 1993-ban* sikeresen mélyhűtöttek embrionális sejteket, ahol a felolvasztást követően a recipiens tojásokba visszajuttatva a sejteket 2-3%-os kiméra produkciót értek el.

Ezt a viszonylag csekély sikert később *Reedy és munkatársai (1995)* azzal magyarázták, hogy a recipiens tojás szubgerminális üregébe injektálható maximális sejtszám 500 körül mozog, és mivel a fagyasztott-felolvasztott sejtek életképessége mindössze 33% volt, az így bejuttatható élő sejtek száma, és ezáltal a hatékonyság is jelentősen elmarad a friss sejtszuspenzió használatához képest. Ivarszervi kimérát mélyhűtött-felolvasztott blasztodermális sejtek felhasználásával házityúkban először *Kino és munkatársai (1997)* hoztak létre. Különböző baromfifajok esetében eltérő hatékonyságúak lehetnek a már korábban alkalmazott fagyasztási protokollok, illetve krioprotektánsok. *Patakiné és munkatársai (2008, 2010, 2016)* vizsgálatai a krioprotektáns kombinációk (10% és 20% DMSO, 5% DMSO+5% etilén-glikol), tároló konténerek (szalma, ampulla), illetve eltérő hűtési sebességek hatásait vizsgálták különböző baromfifajok embrionális sejtjein. Őshonos tyúkfajtáink és két őshonos pulykafajtánk esetében nem találtak jelentős különbséget mélyhűthetőség tekintetében, míg a védőanyag hozzáadását követően a magyar lúd élő sejtaránya jelentősen meghaladta tyúkfajták és pulyka esetében tapasztaltakat (*Sztán et al. 2012*). Ez alapján feltételezhető, hogy a lúd blasztodermális sejtek a legkevésbé érzékenyek a védőanyagok toxikus hatásaira. Házityúk fajban vitrifikációs kísérleteket is végeztek (*Patakiné et al. 2012*), melynek legfőbb korlátja az, hogy a használatban lévő kriokonténerek (cryotop, cryoloop) nem alkalmasak a blasztodermális sejtek segítségével történő kiméra-előállításához szükséges viszonylag nagyszámú (800-1000 db) sejt lefagyasztására. Egy újonnan fejlesztett hálós hordozófelület összehasonlítva a pelletek vitrifikációjával azonban ígéretes eredményre vezetett.

Az első sikeres kísérletről, melyben a PGC-ket lassú mélyhűtéssel tárolták, és felolvasztás után ivarszervi kimérát állítottak elő, *1994-ben* számoltak be *Naito és munkatársai*. Ezt követően a PG sejtek krioprezervációjára irányuló kutatások zömmel a lassú mélyhűtési módszeren alapultak (*Nandi et al. 2016, Moore et al. 2006, Setioko et al. 2007, Nakamura et al., 2011, 2013, Kohara et al. 2008, Tajima et al. 1998*). A lassú mélyhűtési módszereket általában szérumtartalmú hűtőmediumokkal, 5- illetve 10% DMSO (*Nandi et al. 2016, Naito et al, 1994, Kohara et al., 2008, Tajima et al., 1998*) vagy etilén glikol (*Moore et al.,2006*) hozzáadásával alkalmazzák. A kereskedelemben kaphatók előre bekevert hűtőközegek is, azokat is jó hatásfokkal használják a gyakorlatban (*Setioko et al. 2007, Nakamura et al.,2011, 2013*). Eddig viszonylag kevés publikáció született PGC-k vitrifikációjáról annak ellenére, hogy ez a módszer emlős petesejtek (*Smith et al. 2010, Rienzi et al. 2012*), embriók (*Vanderzwalmen et al. 2009, 2012, Li et al. 2012*) és őssejtek (*Reubinoff et al. 2001, Li, T. et al. 2010, Li, Y. et al., 2010*) esetében jóval hatékonyabbnak bizonyult a lassú mélyhűtésnél.

Kohara és munkatársai 2008-ban először számoltak be csirke GGC-k sikeres vitrifikációjáról, a *Nakao és munkatársai (1997)* által egér embriókra kifejlesztett protokoll alkalmazásával. A sejtek életképessége felolvasztást követően elmaradt a lassú mélyhűtési módszerek alkalmazásakor tapasztaltakhoz képest, ezzel szemben a két módszer esetében a sejtek recipiensbe ültetését követően az ivarszerv kolonizációs hatékonyság azonos mértékűnek bizonyult. *Kim és munkatársai (2013)* is megerősítették a korábban kapott eredményeket, miszerint a sejtek életképessége szignifikánsan alacsonyabb volt vitrifikáció után, mint lassú mélyhűtési módszer alkalmazását követően. Ezek az eredmények ellentmondanak az emlős embriók és őssejtek vitrifikációval történő krioprezervációja során tapasztaltaknak.

4.5 A kiméra előállítás lehetséges módszerei

Madarak esetében, ha a donor embrionális eredetű őssejteket recipiens embrióba injektáljuk vagy egér esetében nyolcsejtes embrióval aggregáltatjuk (*Nagy et al. 1990*), azok képesek beépülni a befogadó (recipiens) embrióba. Az ilyen módon létrehozott kiméra embrió, illetve a megszülető/kikelő kiméra utód különféle szöveteiben, szerveiben megtalálhatók lesznek a donor őssejtekből létrejött utódsejtek (*Petitte et al. 1990; Thoraval et al., 1995*). Az így létrehozott kimérák két eltérő genotípusú (donor/recipiens) sejtvonalat egyaránt tartalmaznak (*Munro, 1977; Nilsson and Cloud, 1992*). A donor sejtek elhelyezkedése szerint megkülönböztethetünk szomatikus vagy ivarszervi kimérákat. Szomatikus kiméráról akkor beszélhetünk, ha a donor embrióból származó utódsejtek csak a testi sejtek között találhatóak meg, vagyis az eltérő eredetű és genotípusú (donor/recipiens) sejtek keveredése csak a szomatikus szövetekben történik meg. Ivarszervi kiméráról abban az esetben van szó, ha a donor sejtvonalból származó sejtek a recipiens egyed ivarszerveibe is beépülnek, és ott ivarsejtekké is képesek differenciálódni (*Patakiné Várkonyi et al. 2017*). Ebben az esetben a kiméra egyedek ivarszerveiben donor és recipiens eredetű, két eltérő genotípusú ivarsejt is termelődik (*Héjja et al. 2006*). Az embrionális sejtek mélyhűtésének és visszaültetésének végső célja olyan ivarszervi kiméra egyedek előállítása, amelyek ivarszervei csak a megőrzendő (donor) fajta genomját tartalmazzák, így az első generációban visszanyerhető a kívánt genotípus. Jelenleg madarak esetében az embrionális eredetű sejtek átvitelével történő kiméra előállításnak két megközelítése ismert. Az egyik a pluripotens embrionális blasztodermális sejtek (BC) mikroinjektálásán alapul, a másik középpontjában az ősvarsejtek (PGC) alkalmazása áll (*Patakiné Várkonyi et al. 2017*).

A blasztoermális sejtek segítségével történő kiméra előállításának hátrányai, hogy a recipiens tojás szubgerminális üregébe injektált donor blasztoermális sejtek beépülése random, mozaikos, így az ivarszervi kimérák létrejöttének esélye alacsonyabb, valamint ezen sejtek hosszútávú fenntartása kiméra alkotó képességüket megtartva csak fagyasztott állapotban lehetséges (Laval and Pain, 2010). Ezen módszer előnye, hogy egyszerűbb, olcsóbban kivitelezhető. A PG sejtek felhasználásával történő ivarszervi kiméra előállítás előnye, hogy célzottan, a recipiens embrió véráramába megfelelő időablakban bejuttatva ezeket a sejteket hatékonyabban állítható elő csíravonalas kiméra utód, ellenben nagyobb a laboratóriumi háttér, anyagi erőforrás és gyakorlat igénye.

A PG sejtek segítségével történő ivarszervi kimérák előállításának hatékonysága növelhető, ha a recipiens egyedek saját ivarsejtjeinek termelését gátoljuk/megakadályozzuk, így a kiméra csak az általunk beültetett PG sejtekből származó ivarsejteket termeli majd. Ennek több módszere is rendelkezésre áll. Gátolhatjuk a recipiens embriók saját ivarsejt termelését UV, illetve röntgen besugárzással (Carsience et al. 1993; Etches et al. 1996; Fraser et al. 1993; Thoraval et al. 1994; Macdonald et al. 2010), de ezen módszerek hátránya, hogy a kezelt embriók túlélése, növekedési erélye elmaradt a kezeletlenekéhez képest (Carsience et al. 1993). Egy másik lehetséges módszer a recipiensek buszulfán kezelése (Aige-Gil et al. 1991; Reynaud 1969; Bresler et al. 1994), amely egy akriláló anyag, hatékonyan és visszafordíthatatlanul károsítja a recipiens saját csírasejtjeit, de 10 óra elteltével lebomlik. Használatával a donor sejtek 99,5%-os hatékonysággal kolonizálták a recipiens ivarszervet madarak esetében (Nakamura et al. 2010b). Napjainkban a precíziós genom-manipulációs módszerek is lehetőséget adnak steril recipiens létrehozására, Taylor és munkatársai 2017-ben TALEN-közvetített steril recipiens embriókat hoztak létre, amely hatékony és előremutató módja a steril recipiens egyed előállításának, azonban ez a módszer a számos országban hatályban lévő szigorú GMO szabályozás illetve tilalom miatt aggályos lehet. További lehetőség egy fajok közötti, steril hibrid recipiens egyed létrehozása, mely saját csírasejteket nem termel. Létrehoztak számos fácán faj-gyöngytyúk faj hibridet (McCarthy et al. 2006, Molnár et al. 2019), ugyanis ez a két faj genetikailag viszonylag közel áll egymáshoz (Szalay, 2015). Hanebrink (1973) elsőként írt le természetben előforduló gyöngytyúk-páva, valamint gyöngytyúk-házityúk hibrideket (Hanebrink, 1973). Házityúk és japán fürj hibridet (Mitsumoto és Nishida, 1958, Wilcox és Clark, 1961), tyúk-pulyka hibridet (Warren and Scott, 1935) is létrehoztak az évek során. Ezeknek a fajoknak a hibridjei esetében bebizonyosodott, hogy csak néhány termékeny tojást, illetve embriót sikerült nyerni (Olson, 1960), tehát elviekben a célnak megfelelőhetnek.

Ghigi leírása szerint (*Ghigi, 1936*) a házityúk-gyöngytyúk, valamint a gyöngytyúk-páva keresztezésekkel kizárólag hímvivarú utódok hozhatók létre, továbbá *Cole és Hollander (1950)* arra a megállapításra jutottak, hogy a hím galamb és tojó gerle keresztezése is csak hímvivarú utódokat eredményezett, ellenkező nemű párosítás esetén viszont mindkét nemű utódokat kaptak. *Molnár és munkatársai (2019)* házityúk és gyöngytyúk keresztezési kísérleteik során megállapították, hogy a gyöngytyúk tojó-házityúk kakas keresztezés jóval hatékonyabb (6,7% kikelt, egészséges egyed), mint a fordított ivarú keresztezés (0,14% - egy kikelt állat). A kikelt utódok mindegyike steril volt, és fluoreszcensen jelölt PG sejtek injektálásával az is bizonyítást nyert, hogy az ivarszervük alkalmas házityúk ősvarsejtjeinek befogadására.

4.6. Az embrionális sejtekkel végzett kutatások gyakorlati jelentősége

4.6.1. Embrionális sejtek segítségével történő génmegőrzés a veszélyeztetett madárfajok, az őshonos baromfifajták és a gazdasági szereplők számára

Őshonos, védett, illetve veszélyeztetett madárfajaink / fajtáink *in vitro* génmegőrzésének napjainkban több módszere is ismert. Lehetőség van a sperma mélyhűtött tárolására, melynek hatékonysága madarak esetében fajtánként, fajonként, vonalanként, de egyes esetekben egyedenként is igen eltérő (*Tajima et al. 1990; Chalah et al. 1999*). Ezen felül az embrionális őssejtek (blasztodermális sejtek, ősvarsejtek) hosszútávú tárolásával, majd ezek recipiens egyedekbe történő visszaültetésével is megvalósítható a megőrizni kívánt genotípus visszanyerése.

Napjainkra számos házityúk-fajtából – köztük őshonos vonalokból is – sikerült ősvarsejt tenyészeteket alapítani (*van de Lavoie et al. 2006; Macdonald et al. 2010; Miyahara et al. 2014; Tonus et al. 2016; Lázár et al. 2021*). A folyamat szempontjából ennek a legnagyobb előnye az, hogy egyedi embriókból is lehetséges a mélyhűtéshez és az injektáláshoz elegendő számú PG-sejtet előállítani, ami elősegíti a minél szélesebb alapokon nyugvó genetikai információ tárolását. Korábbi vizsgálatokban bizonyítást nyert, hogy egy populáció által hordozott genetikai sokszínűség megőrzéséhez nemenként minimum 15–25 egyedből származó ősvarsejt tenyésztetre van szükség (*FAO, 1998*). Természetesen ezt a célszámot minden faj, fajta vagy vonal esetében külön érdemes vizsgálni, és a mintavételt a populáció genetikai tulajdonságai és nagysága alapján kell meghatározni. Ugyan a PG-sejtek izolálásához, *in vitro* tenyésztéséhez és mélyhűtéséhez szükséges infrastruktúra és vegyszer költséges, a ráfordítás mégis jóval elmarad egy *ex situ* állomány folyamatos fenntartásával járó kiadásoktól, ráadásul az így tárolt sejtek védettek a fertőzésekkel, szaporodásbiológiai problémákkal és egyes környezeti károsításokkal szemben.

Ez fontos szempont lehet nem csak a veszélyeztetett fajok / fajták, hanem az intenzív fajták esetében is, különösen lúd fajban, ahol az értékes genetikai anyagot hordozó állományok *in vivo* fenntartása a szezonális tojástermelés, a nagy testméret és a nehezen kezelhető, nagy nitrogén tartalmú és -mennyiségű trágya miatt igen költséges. Ezek miatt a tények miatt reális igény merül fel ezen módszerek további fejlesztésére, egyszerűbbé, olcsóbbá tételére. A genetikai információ ősvarsejtek formájában való tárolásának a biztonságon kívül van egy további előnye, az, hogy jóval olcsóbban és hatékonyabban szállíthatók. Az első mélyhűtve szállítást célzó kísérletek sikerrel zárultak (Nakamura *et al.* 2016). A jövőben ennek a ténynek igen nagy jelentősége lehet egy őssejt alapú, az értékes genetikai anyag hosszú távú, hatékony megőrzését szolgáló rendszer kiépítésénél is. Az itt leírt módszerek jelenleg is alkalmasak a fejlett génbanki megőrzés igényeinek kiszolgálására, például Japánban már napjainkban is több őshonos házityúk- és gyöngytyúkfajta krioprezervációját ősvarsejtekkel is végzik (Nakamura *et al.* 2010a). Reményeink szerint hazánkban is egyre inkább teret nyerhet ez a módszer, ami eredményesen egészítheti ki a már létező, főként spermafagyasztáson alapuló *in vitro* génmegőrzési stratégiákat.

4.6.2. Ősvarsejtek génszerkesztésének lehetősége, felhasználása a madaraknál

Domesztikált madárfajaink jelentősége napjainkban a hús és tojás, valamint egyéb termékek előállításán felül igen szerteágazó, például nagy jelentőségük lehet a gyógyszeripar számára szükséges különféle fehérjék termeltetésében is bioreaktorként (Harvey *et al.* 2003). A házityúk továbbá felbecsülhetetlen értékű modell az alapvető immunológiai folyamatok tanulmányozásában (Davison, 2003). A különböző fertőző betegségek állandó fenyegetést jelentenek a baromfiágazatra, valamint az esetlegesen bekövetkező zoonózisok terjedése is aggályos. A génszerkesztés eszközei segíthetnek a madarak betegségekkel szembeni ellenálló képességének, valamint a különféle gének szabályozásának vizsgálatával a baromfitenyésztésre gyakorolt éghajlati hatásának kezelésében.

A hosszú távú *in vitro* PGC tenyésztési rendszerek létrehozását megelőzően a madaraknál alkalmazott fő transzgenikus technológia vírusvektorok bejuttatásán alapult az EG&K X. stádiumú embriókba. Az első transzgenikus madár egy rekombináns leukózis vírus mikroinjektálásával előállított házityúk volt (Salter *et al.* 1986). Ezt követően Vick és munkatársai (1993) sikeresen hoztak létre transzgenikus házityúkot retrovírusok segítségével genetikailag módosított PG sejtek bejuttatásával.

Mizuarai és munkatársai (2001) transzgenikus fürjeket hoztak létre retrovírus vektor közvetlen injektálásával a blasztodermális stádiumú embriókba.

Mivel a transzgenikus állatok genomjába véletlenszerűen integrálódott transz gének gyakran csendesítés alá kerültek (Bosselman et al. 1989; Jahner et al. 1982; Challita et al. 1994), a lentivírus rendszert hatékonyabb vírustranszdukciós módszernek ítélték, mivel ezzel a módszerrel sikeresen állítottak elő különféle transzgenikus házityúkokat géncsendesítés nélkül (McGrew et al. 2004; Chapman et al. 2005; Scott and Lois, 2005; Lillico et al. 2007). Agate és munkatársai (2009) elsőként állítottak elő zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) expresszáló transzgenikus pinyeket blasztodermális stádiumba történő lentivírus mikroinjektálással. Eközben Shin és munkatársai (2008) sikeresen hoztak létre transzgenikus fűrjeket gPGC-k és lentivírus vektor alkalmazásával, inkubációs módszerrel. Bár ennek a módszernek a hatékonysága hasonló volt a közvetlenül a blasztodermába injektált vírusvektorokéhoz, mégis lehetővé vált általa, hogy vírus transzfecció útján transzgenikus madarakat hozzanak létre, sejttenyésztés nélkül, közvetlenül tisztított PG sejteket alkalmazva. Másrészt sok erőfeszítés történt a nem vírus alapú transzgenikus rendszerek fejlesztésére őssejtek alkalmazása nélkül, mint például a sperma-közvetített géntranszfecció (Nakanishi and Iritani, 1993; Collares et al. 2011) vagy a transz gének közvetlen mikroinjektálása a megtermékenyített petesejtekbe (Love et al. 1994). Ezeknek a stratégiáknak a hatékonysága azonban nem érte el a PGC-k által közvetített transzgenézist a bejuttatott gének csírvonalba történő beépülését illetően.

A hosszú távú *in vitro* sejttenyésztési módszerek kidolgozásának köszönhetően a PG sejteken alapuló transzgenézis a fent említett megközelítéseknel hatékonyabb és egyszerűbb módszernek bizonyult a génmódosított madarak létrehozására. Következő lépésként egy rendkívül hatékony nem vírus alapú rendszert fejlesztettek ki a transz gének stabil genomi integrációjának megvalósításához; a PGC-k genomjába beépülő elemek, például piggyBac és Tol2 transzpozonok felhasználásával (Macdonald et al. 2012; Park et al. 2012). A tenyésztett PG sejtek genomjába történő transzgen bejuttatása lipofektin vagy elektroporáció segítségével jelentősen növelte a hatékonyságot. A közelmúltban a piggyBac transzpozon alapú rendszert továbbfejlesztették Flipase rekombinááz felismerő szekvenciákkal a helyspecifikus génkazetta-csere megvalósítása céljából (Lee et al. 2016). Olyan madárfajok esetében, ahol a PG sejtek *in vitro* fenntartása nehezen- illetve nem kivitelezhető, HH14-16 stádiumú embriók véráramába közvetlenül fecskendeztek transzfecció reagenseket több vizsgálatban (Zhang et al. 2012; Tyack et al. 2013; Lambeth et al. 2016). A következő nagy előrelépés a területen 2013 -ban történt, amikor a CRISPR-t, amely a mikrobiális adaptív immunrendszer része, adaptálták az eukarióta sejtek genomszerkesztésére (Cong et al. 2013). Mivel a CRISPR/Cas9 alapú genomszerkesztési eljárások rendkívül hatékonyak bizonyulnak a cél faj genomjának módosításában, ezek a módszerek forradalmasíthatják a madarak genomjának manipulálására irányuló erőfeszítéseket.

Számos kutatást publikáltak, amelyek a PG sejtek génszerkesztett házityúkok előállítására történő felhasználására épülnek, beleértve a homológ rekombinációt (*Schusser et al. 2013*), a TALEN (*Taylor et al. 2017; Woodcock et al. 2019*), és a CRISPR/Cas9 rendszert (*Dimitrov et al. 2016; Oishi et al. 2016*). A genomszerkesztési eljárások közül a CRISPR/Cas9-t sikeresen alkalmazták házityúk PG sejteken funkcionális genetikai modellek létrehozásához: PG sejtek immunglobulin nehézlánc lókuszának célzott módosítására gyógyszerrezisztens utódok létrehozása céljából (*Dimitrov et al. 2016*), ovomukoid génkiütött állatok (*Oishi et al. 2016*) és myostatin génkiütés esetében (*Kim et al. 2020*).

A hosszútávú tenyészetben fenntartott PGC-eket felhasználva a genommanipuláció eredményesnek bizonyult madárbetegségekkel kapcsolatos vizsgálatok esetében is. A madárinfluenza vírus (IAV) elleni küzdelem, mely napjaink fontos megoldandó feladata, igen komoly kihívásokat állít a kutatók elé. *Long és munkatársai (2019)* a CRISPR/Cas9 segítségével kiütötte az ANP32A gént, mely egy, a madárinfluenza vírus polimeráz aktivitásában fontos szerepet játszó protein termeléséért felelős (*Baker et al. 2018*). Ennek eredményeképpen a génmódosított PG sejtekből származó fibroblaszt sejtek ellenálltak a madárinfluenza fertőzésnek. *Koslová kutatócsoportja és Hellmich és munkatársai* a CRISPR/Cas9 segítségével génszerkesztett ősvarsejteket hoztak létre, amelyekből olyan baromfi egyedek jöttek létre, amelyek *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is ALV-J (madár leukózis vírus, „J” alcsoport) rezisztensek voltak (*Koslová et al. 2020; Hellmich et al. 2020*). A génszerkesztett PGC-k embrionális injektálási kísérleteiből származó génmódosított utódok létrehozásának hatékonysága változó, és általában 1-50% közöttire tehető (*Panda and McGrew, 2021*).

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. Állatkísérletek etikai vonatkozásai

A dolgozatban szereplő kísérleti állományokat a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK HGI) tartottam, a Magyar Állatvédelmi Törvénynek (1998. XXVIII) megfelelő módon. Intézetünk rendelkezik a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állat-egészségügyi és Állatvédelmi Igazgatóságának állatkísérleti engedélyével (*engedélyszám: 1/1512/49/15/2/2012*). Az általam végrehajtott kísérleti módszereket az NBGK-HGI Intézményi Etikai Felülvizsgálati Testülete jóváhagyta (*7/2011 számmal*), minden vizsgálatot az Intézet jóváhagyásával végeztem.

5.2. Kísérleti elrendezés

A kísérletek tervezésekor három kísérleti csoportot alakítottam ki. Mivel a blasztodermális sejtek intrakardiális injektálásának lehetséges hatásaira vonatkozóan nem volt semmilyen irodalmi adat, ezért az injektálási módszer embriófejlődésre gyakorolt káros hatásainak vizsgálata céljából két kontrollkísérletet állítottam be (K1, K2), ahol a K1 csoportnál ablakot nyitottam a lúdtojás héján, majd parafilmmel visszazártam és a tojásokat kikeltettem. A K2 csoportban szintén ablakot nyitottam a tojáson, intrakardiálisan injektáltam az embriót steril DMEM tápoldattal, majd visszazártam a tojást parafilmmel és kikeltettem a tojásokat. A harmadik kísérleti csoport (T) volt maga a tervezett vizsgálat, ahol a tojásokon ablakot nyitottam, a recipiens embrió szívcsövébe DMEM tápoldatban szuszpendált korai embrionális sejteket injektáltam, majd a tojást parafilmmel visszazártam és kikeltettem.

5.3. A vizsgálatokban résztvevő magyar lúd fajta jellemzése

A magyar lúd három színváltozatban (fehér, szürke és tarka), valamint fodros tollú változatban fordul elő, mely csupán tollainak szerkezetében mutat eltérést a magyar lúdtól, és feltehetően annak egy mutációja révén jött létre. A jelenlegi fajta a magyar parlagi lúd hazánkba került külföldi fajtákkal (emdeni, olasz, pomerániai, kínai hattyú, rajnai) történt keresztezés útján jött létre. Fehér változata a leggyakoribb. Csőre narancssárga színű, idősebb korban sötétebb, közepesen hosszú. Szeme világoskék, a gúnár nyaka közepesen hosszú, erős, enyhén ívelt. Törzse hosszú és közepes vastagságú, gömbölyded. Melle széles és gömbölyű, erősen izmolt, háta hosszú, széles és egyenes, csak enyhén lehajló. Szárnyai hosszúak, szorosan a testhez simulnak, nagyok. Farka zárt, vízszintes és rövid, combja vastag, erősen izmolt. Lábai erőteljesek, függőleges állásúak, a csőrrel azonos színűek.

Tollazata testhez simuló, a fodros tollú változat szárnyfedőtollai, combtollai, farktollai hosszúak, puhák és szalagszerűen, látványosan fodrozódnak, pehelytollazata vastag (2. ábra). Középnagy testű fajta, tojója átlagosan 5–6, gúnárja 6–8 kg súlyú. A tojó felépítése lényegében megegyezik a gúnáréval, néhány apróbb, másodlagos nemi jellegből fakadó különbségtől eltekintve (valamivel rövidebb, vékonyabb, kevésbé hajlott nyak, kissé mélyebben elhelyezkedő törzs). A magyar lúd igénytelen, gyorsan növekvő, jól tollasodó, edzett és fáradhatatlanul legelő fajta, a takarmányt nagyon jól értékesíti. Húsa kitűnő minőségű és puha, májtermelése jó. Tollhaszna tetemes, évente három-négyszer is téphető. (Szalay, 2015)



2. ábra: Állományfotó a kísérletben szereplő lúd szülőpár csoportról

5.4. A lúd szülőpár csoportok kialakítása mikroszatellit-marker vizsgálatok alapján

A magyar lúd esetében fenotípusos markereket (pl. szín) nem vehettem figyelembe, mivel ennél a fajtánál a szín nem szorosan kapcsolódik a genotípushoz, így molekuláris genetikai marker alkalmazására volt szükség a donor sejtek beépülésének vizsgálatára. A recipiens egyedekben jelenlévő donor sejtek kimutatására mikroszatellit markerek állnak rendelkezésünkre (Zhou és Lamont, 1999). Olyan egyedeket választottam ki az egyes családok kialakításához, melyek az általam kiválasztott lúd-specifikus mikroszatellit marker, a Bca μ 3 (forward, 5'-ATACCAACACAGCCACCCACAT-3'; reverse, 5'-CCTTCCTGTCCTTCAAATTCTT-3'; (Buchholz et al. 1998) esetében különböző allélokkal rendelkeznek homozigóta formában.

A megfelelő donor és recipiens családok felállításához elvégeztem a rendelkezésemre álló állomány genotipizálását mikroszatellit markerekkel. Ehhez 144 állat szárnyvénájából vettem 500-700 µl mennyiségű vért nátrium-citrátot tartalmazó 1,5 µl-es eppendorf csőbe, hogy a koagulációt megelőzzem. A vérmintákból hagyományos kisózásos módszerrel (*Miller et al. 1988*) DNS-t izoláltam. A vérmintákat 1 ml sejt lízis pufferben (*1. melléklet*) újraszuszpendáltam, 1 órán keresztül 37°C-on inkubáltam, majd 13000 rpm-en 2 percig centrifugáltam. A felülúszó leszívását követően ismét 1 ml sejt lízis puffer került a mintákra, amiket átforgatás után újra a centrifugába helyeztem és 13000 rpm-el 2 percen keresztül centrifugáltam. Centrifugálás és a felülúszó ismételt eltávolítása után 300 µl sejtmag lízis pufferben (*2. melléklet*) és 20µl 10%-os SDS-ben inkubáltam a véreket 30 percig 37°C-on. Ezt követően 100 µl 6M (túltelített) NaCl-ot adtam az egyes csövekhez, majd 20 másodperc vortexelést követően 10 percig 13000 rpm-en centrifugáltam. A DNS kicsapásához 300 µl izopropanolra rámértem az azonos mennyiségű felülúszót, átforgattam a DNS kiválásáig, majd ismét 13000 rpm-el 2 percig centrifugáltam. A kicsapáshoz használt izopropanolt eltávolítottam, és minden mintára 500 µl 70%-os etanolt mértem, amellyel átforgatva tisztítottam a DNS-t. 13000 rpm-en 2 perc centrifugálás után ezt a lépést még egyszer megismételtem, majd az etanolt leszívtam a mintákról, és 1 órán keresztül szárítottam azokat. A szárított DNS-t 50 µl desztillált vízben 37°C-on egy éjszakán keresztül visszaoldottam. A minták DNS koncentrációjának lemerését követően (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific) equalizáltam a vizsgálatokhoz a mintákat a szükséges 5 ng/µl –re, majd a genotípus megállapításának elvégzéséig -20°C-on tároltam azokat. A PCR-termékeket CY5-el (*Bio-science Kft.*) fluoreszcensen jelölt primerek alkalmazásával állítottam elő (*3., 4. melléklet*) és poliakrilamid gélen vizualizáltam Alf Express II automata DNS-analizáló készülék segítségével (*Amersham Pharmacia Biotech®*).

A kapott eredmények alapján alakítottam ki a donor és a recipiens kísérleti csoportot. A donor állomány kiválasztott 28 egyede a **155bp** hosszúságú allélt hordozta homozigóta formában, míg a recipiens állomány kiválasztott 35 egyede egy másik, a **159bp** hosszúságú alléllal rendelkező szintén homozigóta formában.

5.5. A kísérleti lúd állományok tartástechnológiája

Mindkét kísérleti szülőpár csoportot tágas kifutóval rendelkező ólakban, mélyalmon helyeztem el. A két csoportot kerítéssel választottam el egymástól. A folyamatos legeltetés és vízellátás mellett az állatok *ad libitum* etetése granulált lúd tojótáppal (*Szinbád Kft. Gödöllő*) történt. A tojásokat naponta kétszer gyűjtötték és 16-18°C-on tojástároló helyiségben tárolták a felhasználásig. Minden tojást egyedileg jelöltek a begyűjtéskor (begyűjtés dátuma, kísérleti csoport jelölése).

5.6. A magyar lúd embriófejlődési stádiumainak meghatározása

A lúd embrionális sejtek injektálásához először meg kellett határoznom az embrió fejlődésének azt a szakaszát, amikor az ősvarsejtek vándorlása történik. Ugyanis ez az az időszak, amikor remélhetem azt, hogy az általam injektált őssejtek egy része is a kialakuló ivarszervekbe vándorol. Házityúknál az embrió ezt a fejlődési stádiumot 52-58 óra (HH13-16) (*Hamburger and Hamilton, 1951*) inkubálás után éri el. Mivel azonban a házilúd embrionális fejlődése 29-31 napig tart, szemben a tyúkével, amely csak 21 nap, vizsgálatokat kellett végezniem arra vonatkozóan, hogy a lúdembrió fejlettsége mikor éri el az injektáláshoz szükséges HH14-16 fejlődési stádiumot. Erre vonatkozóan nem volt adat a szakirodalomban.

A frissen tojt magyar lúd tojásokat 0,25%-os hypochlorit oldattal lemostam, majd a faj igényeihez igazodva 37,7°C-on, 70%-os páratartalom mellett, óránkénti 90°-os forgatással inkubáltam PL Machine MIDI F500S (*PL Maschine KFT. 2461. Tárnok*) keltetőgépben.

A keltetés 60. órájától kezdve a 89. óráig 10 percenként kivettem egy tojást a keltetőgépből, a laterális oldalon közepén tojástörő csipesz segítségével egy ablakot nyitottam, majd a héjhártya eltávolítása után megkerestem a fejlődő embriót, melyet Leica Axioscope sztereómikroszkóp (*Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország*) segítségével vizsgáltam. A részletek alaposabb megfigyelhetősége miatt az embrió alá Fast Green festéket (*Sigma-Aldrich®*, No. F-7252) injektáltam, amely sötét háttérrel biztosított, ezáltal jobban látszottak pl. az embrió szomitái. A vizsgálat alapján meghatároztam a lúd embriók fejlődési stádiumait, a *Hamburger & Hamilton* által kidolgozott (*Hamburger and Hamilton, 1951*) házityúk fejlődési stádiumokat alapul véve. Feljegyeztem az inkubáció hosszát és az embrió fejlettségi stádiumát. A kapott adatokat egy adatbázisban foglaltam össze és fotó dokumentációt készítettem. Összesen 745 lúdembriót vizsgáltam meg (*5.melléklet*).

5.7. Az ősvarsejtek fluoreszcens immunfestése egész lúd embrióban

A HH16-os fejlettségi stádiumú lúdembriókat szűrőpapír gyűrű segítségével eltávolítottam a szik felületéről. Lemostam foszfát pufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS), majd fixáltam 4%-os paraformaldehidet (PFA) tartalmazó PBS oldatban egy éjszakán keresztül 4°C-on. Ezt követően az embriókat 3 alkalommal rázóasztalon 0,01% szarvasmarha szérumból albumint (BSA) tartalmazó PBS oldatban, alkalanként 30 perc időtartamig mostam. Az embriókat 1% BSA-t és 0,1% Triton-X-100-at (*Sigma-Aldrich, X100-100ML*) tartalmazó PBS oldattal permeabilizáltam egy éjszakán keresztül 4°C-on. Ezután szintén 4°C-on az embriót anti-CVH (házityúk VASA homológ) elsődleges antitesttel 1:100-as hígítást alkalmazva (Bertrand Pain ajánlása alapján /CU1208, INSERM, USC1361, INRA, Stem Cell and Brain Research Institute, Bron, France/) 0,1% BSA-t tartalmazó PBS oldatban egy éjszakán keresztül inkubáltam. Másnap 3 alkalommal egymás után alkalanként 30 percig rázótermosztátban mostam a mintát 0,01% BSA-t tartalmazó PBS oldatban szobahőmérsékleten, majd a mintákat fluoreszcein izotiocianát (FITC, 1:500) másodlagos antitesttel (*Jackson Immuno Research*) inkubáltam 0,1% BSA-t tartalmazó PBS oldatban egész éjszakán keresztül 4°C-on. Ezután két, egyenként 30 perces, szobahőmérsékleten elvégzett mosás következett 0,01% BSA-t tartalmazó PBS oldatban. A sejtmagfestést sötétkamrában, szobahőmérsékleten, 15 perc időtartamig végeztem 1 μM TO-PRO™-3 (gerjesztés: 642 nm, detektálás: 661 nm) használatával (*Thermo Fisher Scientific, T3605*) PBS oldatban. Ezt háromszori, 30 perc időtartamú PBS-ben történő mosás követte. A mintákat a mikroszkópos vizsgálatig 0,01%-os BSA-PBS-ben tároltam, 4°C-on. A fotózáshoz a mintákat tárgylemezre helyeztem, majd fedőlemez és Vectashield fedőoldat (*Vector Laboratories, H-1200-10*) segítségével fedtem le, ezt követően a mintákat konfokális mikroszkóp (*TCS SP8; Leica*) segítségével vizsgáltam.

5.8. Lúd blasztodermális sejtszuszpenzió immunfestése ősvarsejt-specifikus markerekkel

Az 5.10. alfejezetben részletezett módon izolált blasztodermális sejteket szuszpendáltam PBS oldatban, majd 10 percig fixáltam 4%-os PFA oldatban 4°C-on. Háromszori, - alkalanként 5-5 perc időtartamú - 0,01% BSA tartalmú PBS oldatban történő mosást követően a sejteket 0,1% Triton-X-100 (*Merck-Millipore X100-100ML*), valamint 2,5% szamár szérumból (*Sigma Normal Donkey Serum A21432-1750277*) tartalmú PBS segítségével blokkoltam 45 percig, szobahőmérsékleten. Ezután pára kamrában 4°C-on inkubáltam a sejteket egész éjszakán át 1:100 hígítású anti-CVH elsődleges antitesttel. Az inkubációt követően három alkalommal mostam a mintákat 5-5 percig 0,01% BSA tartalmú PBS oldattal.

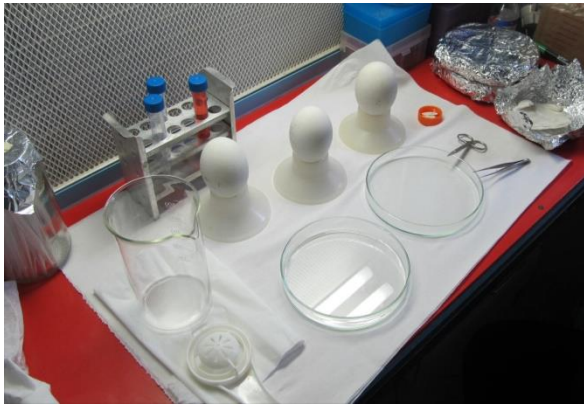
Ezután IgG FITC másodlagos antitesttel (*Jackson Immuno Research*) inkubáltam a sejteket sötét párakamrában 37°C-on, 1 órán keresztül, majd 0,01% BSA tartalmú PBS oldattal való mosást követően a sejtmagokat TO-PRO™-3 festékkel (*Thermo Fisher Scientific, T3605*) festettem. A tárgylemezeket fedőlemez és 10 µl Vectashield fedőoldat (*Vector Laboratories, H-1200-10*) segítségével fedtem le, majd mintákat konfokális mikroszkóp (*TCS SP8; Leica*) segítségével vizsgáltam.

5.9. A recipiens tojások kezelése injektálás előtt

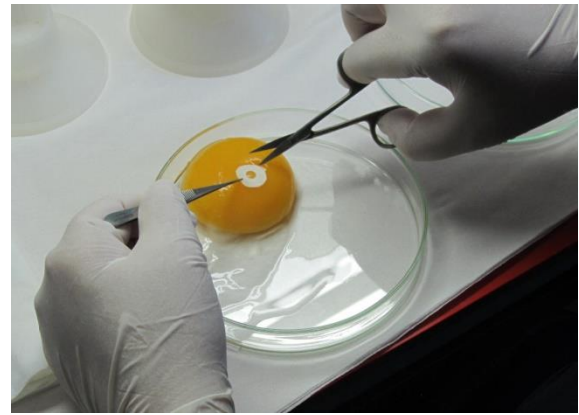
Heti egy alkalommal 30 db recipiens tojást helyeztem a keltetőgépbe (*MIDI F500S; PL Machine*). A lúdtojásokat a fajnak megfelelő körülményeket biztosítva inkubáltam (37,8 °C, 63%-os páratartalom mellett, 90 °-os óránkénti elforgatással). A recipiens tojások injektálását 72 órás inkubációs idő elteltével kezdtem meg.

5.10. A donor blasztodermális sejtek kinyerése

A kísérlet során injektálásra használt donor eredetű blasztodermális sejteket a donor családtól származó, frissen tojt, inkubálatlan, termékeny tojásokból nyertem (*3. ábra*). Ezekben a tojásokban a csírákorong blasztula, pregasztrula állapotban van, kb. 60.000. sejtből áll, ebből csak megközelítőleg 500 vesz részt közvetlenül az embrió kialakításában (*Spratt and Haas, 1961*). A csírapajzs egy-két sejtsornyi vastagságú állományában a sejtek között üreg nincsen, a sejtes lemez közvetlenül a sziken fekszik.



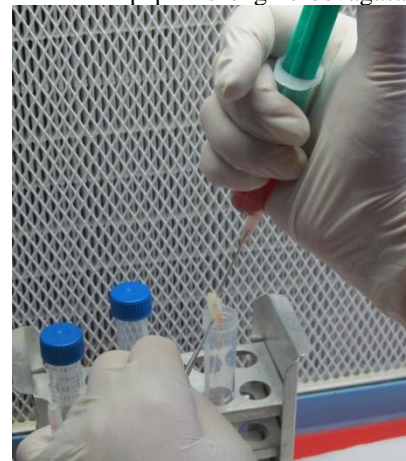
3. ábra: Az előkészített donor tojások, és a blasztodermális sejtuszpenzió elkészítéséhez szükséges eszközök a lamináris fülkében.



4. ábra: A termékeny tojások csírákorongjára helyezett steril szűrőpapír korong körbevágása.



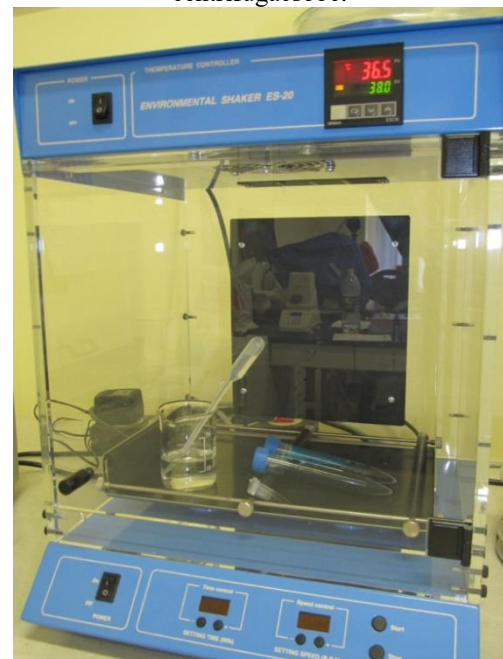
5. ábra: A szűrőpapírhoz tapadt, ollóval eltávolított csírákorong. A felesleges tojás szikanyag eltávolítása steril papírvattával.



6. ábra: A blasztodermális sejtek DMEM tápoldattal történő lemosása centrifugacsőbe.



7. ábra: A „kész”, tisztított sejtuszpenzió Chicago Sky Blue (élő-holt) festést követő sejt számlálása Makler-kamra segítségével, mikroszkóp alatt.



8. ábra: A felhasználásig a blasztodermális sejtuszpenziót termosztátban, 37 °C-on tároltam. A könnyebb nyomon követhetőség miatt Fast-green festékkel festettem a sejtuszpenziót.

A tojásokat felhasználásig, de maximum 4 napig 16-18°C-os tojástároló helységben tároltam. Egy injektálási kísérlethez 14-16 tojás csírákorongjából nyertem ki a sejteket. A tojásokat a fertőzésveszély elkerülése érdekében először 70%-os etanollal áttöröltem, majd óvatosan feltörtem. A termékeny tojások csírákorongjára egy steril szűrőpapír gyűrűt helyeztem (4. ábra), melyet, miután kellően a perivitellin membránhoz tapadt, ollóval körbevágtam, és az eltávolított membrándarabról (5. ábra) a blasztodermális sejteket DMEM „high glucose” (Sigma-Aldrich®, No. D-5671) tápoldattal, steril fecskendő és tű segítségével steril centrifugacsőbe lemostam (6. ábra). Az összegyűjtött sejteket pipetta segítségével a tápoldatban óvatosan felszuszpendáltam, majd 7 percig 2300 rpm-en, 4°C-on centrifugáltam. A sejteket a csapadék felső rétegéből óvatosan leszívtam, majd 2,5 ml steril DMEM tápoldatban újraszuszpendáltam. A törmelékek és a szik minél hatékonyabb eltávolítása érdekében ezt a lépést még egyszer megismételtem. A második centrifugálást követően a felülúszó nagy része eltávolításra került, mindössze 0,5 ml, a sejteket is tartalmazó médiumot hagytam meg. A sejtek életképességének vizsgálatát Chicago Sky Blue élő-holt festéssel (Kútvölgyi et al, 2006), Makler-kamra segítségével történő számlálással határoztam meg (7. ábra). A kész sejtsuszpenziót 10µl Fast Green festékkel (Sigma-Aldrich®, No. F-7252) festettem meg, majd felhasználásig termosztátban (Mammert BE 200, Schwabach, Germany) tároltam 37°C-on (8. ábra).

5.11. Donor korai embrionális sejtek injektálása 3 napos recipiens lúdembrióba

A donor őssejtek injektálásához az optimális inkubációs időt (69-84h) a korábban elvégzett embriófejlődési vizsgálataim alapján határoztam meg. Az előkísérletek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a 72 óránál fiatalabb embriók 10 napos túlélése sokkal rosszabb, mint a 72 óránál idősebbeké, ezért a további kísérleteimben csak a 72 óránál idősebb embriókat injektáltam. A keltetőgépből egyesével elkezdtem kivenni a recipiens tojásokat. A tojás laterális oldalán, illetve a tompa végén a fertőzések megelőzése céljából betadine oldatos (Egis) fertőtlenítést végeztem. A légkamra felőli oldalon egy hegyes csipesszel kicsi, 1mm átmérőjű lyukat ütöttem, melyen keresztül egy steril injekciós tű és fecskendő használatával 0,5 ml fehérjét szívtam le (9. ábra). Erre azért volt szükség, hogy az injektálás során a fejlődő embrió számomra kedvezőbb helyzetbe kerüljön, és könnyebben hozzáférhetővé váljon. Ezt követően a tojás laterális oldalán, a tojáshéjon egy 15x15 mm-nél nem nagyobb nyílást nyitottam, majd ezt követően eltávolítottam a héjhártyát (10. ábra). A tojást egy steril papírvattával bélelt petri-csészébe helyeztem, mely a támasztási funkciót látta el.

Körülbelül 0,5 ml, 10% penicillin – streptomycin-t (*G-6784; Sigma*) tartalmazó steril, 37°C-os PBS oldatot cseppentettem fecskendővel a tojáson nyitott részbe a fertőzések megelőzése, valamint az embrió kiszáradásának elkerülése miatt. Így tettem a tojást a sztereomikroszkóp alá (*11. ábra*), ahol az embrió fejlettségi, egészségi állapota, szervei már jól láthatóvá váltak. A már korábban beállított mikromanipulátorba (*MN 153; Narishige*) egy 10 µl-es Hamilton fecskendőt rögzítettem, melynek végére egy húzott üveg kapilláris került (*No. 2930208, Lot 1610331; Marienfeld Laboratory Glassware*). Az ebbe a fecskendőbe felszívandó donor sejtszuszpenziót előzetesen vitális Fast Green (*Sigma-Aldrich*) festékkel festettem meg, hogy ezzel jobban láthatóvá tegyem a donor sejtek a recipiens embrió véráramába történő bejutását.

A mikromanipulátor segítségével az extraembrionális hárttyák átszúrása után a recipiens embrió szívcsövébe injektáltam 1-1,5 µl (megközelítőleg 600-800 sejtet tartalmazó) donor sejtszuszpenziót (*12. ábra*). A sikeres injektálást követően az antibiotikus PBS oldatból ismét néhány cseppet a tojásba cseppentettem (*13. ábra*), majd a manipulációhoz használt „ablakot” a tojáson felhevített dupla réteg parafilmmel lezártam (*14. ábra*). A tompa végen nyitott apró, a fehérje eltávolítása céljából nyitott lyukat papírragasztóval zártam le. A tojásokat egyedi jelöléssel láttam el, és azonnal visszahelyeztem a keltetőgépbe.



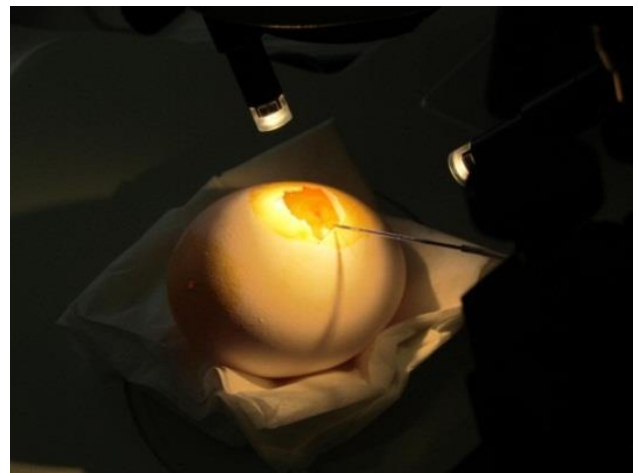
9. ábra: 0,5 ml albumen eltávolítása



10. ábra: A 3 napos lúdembrió vizsgálata



11. ábra: Kamerával és mikromanipulátorral felszerelt mikroszkóp az injektáláshoz



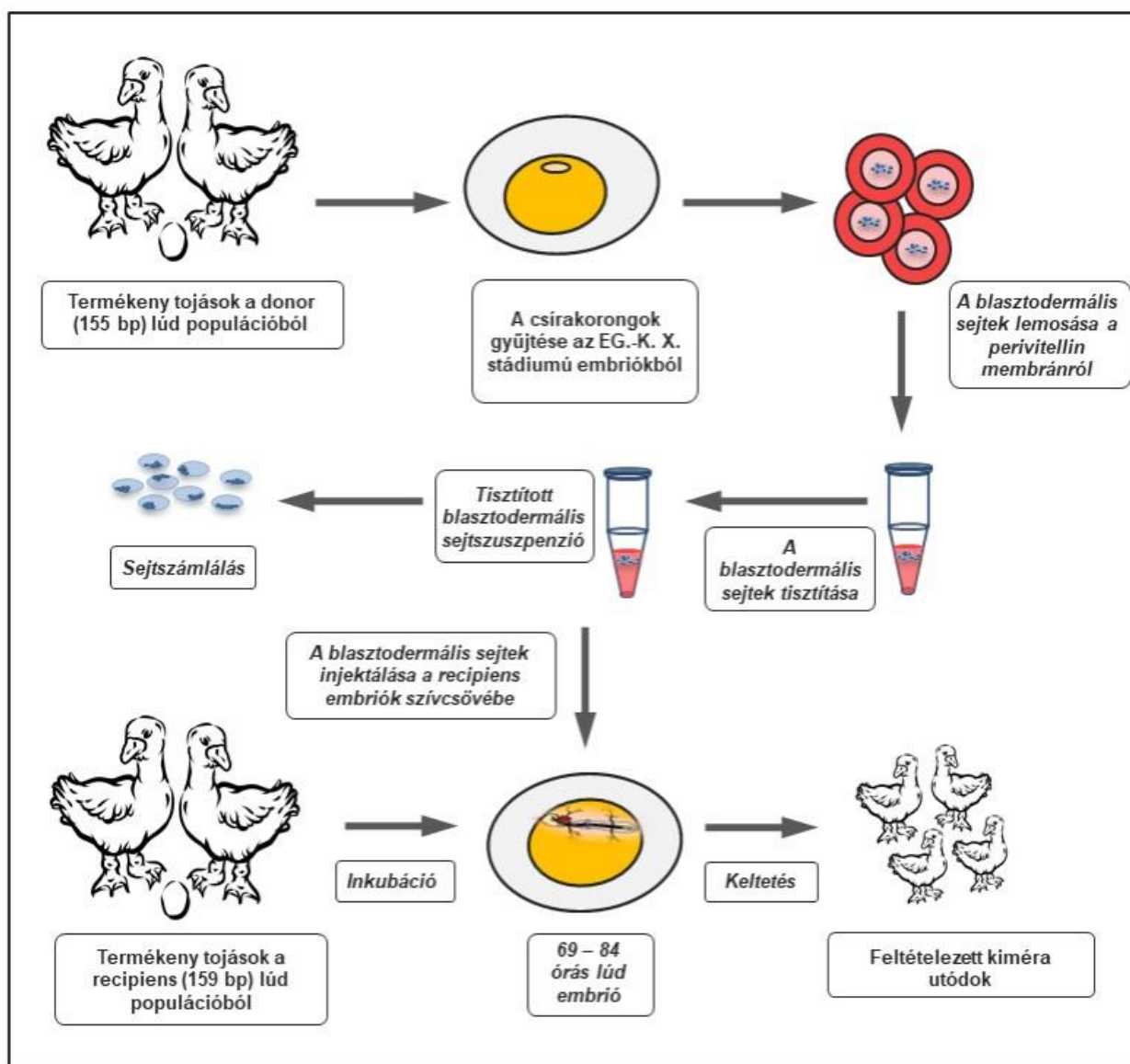
12. ábra: Az injektálás folyamata



13. ábra: A tojás feltöltése 37°C-os steril PBS-el



14. ábra: Az ablak lezárása laboratóriumi parafilmmel



15. ábra: A lúdkiméra előállítási kísérletek folyamatábrája:

A blastodermális sejtuszpenzió elkészítéséhez a donor állománytól (155 bp markert tartalmazó) származó termékeny (EG&K X-XII stádiumú) tojásokat használtam. A sejteket lemostam a perivitellin membránról, ezt követően többszöri szuszpendálással és centrifugálással tisztítottam. Az előállított sejtuszpenzióban sejtszámlálással határoztam meg a sejtek mennyiségét, majd ezt követően meghatározott dózisban (1-1,5 μ l, ~ 600-800 sejt) a recipiens embriókba (159 bp markert tartalmazó) injektáltam. Az injektálást Narishige mikromanipulátorhoz rögzített Hamilton fecskendő és mikrokapillaris segítségével hajtottam végre a recipiens embriók szívcsővébe. Injektálást követően a recipiens embriókat tartalmazó tojásokat keltetőgépbe helyeztem, és fejlődésüket a kikelésig követtem. Az utódokon mikroszatellit-marker analízis végeztem a lehetséges kimériszuszus megállapítása céljából.

A teljes folyamatot a donor- és recipiens egyedektől történő tojásgyűjtéstől a kezelt egyedek kikeléséig a 15. ábra mutatja be. Egy-egy kísérleti napon átlagosan 15-25 sikeres injektálás történt azonos sejtuszpenzióval.

5.12. Az injektált tojások inkubálása, lámpázása, az embrióelhalások idejének és lehetséges okainak vizsgálata.

A lúdtojások keltetése eltér a tyúktojásétól, különösen a hűtés és a páratartalom tekintetében. A lúdtojások keltetési hőmérséklete az 1-12. napig 37,8°C, a 13. naptól a 23. napig 37,5°C, a 27. naptól a 30. napig pedig 37,2°C. Ezzel párhuzamosan az optimális relatív páratartalom a fejlődés első négy napján 63%, az 5. naptól a 27. napig fokozatosan emelkedik 54%-tól 57%-ig, majd az utolsó két napban a bújtatás időtartama alatt felugrik 77-80%-ra (Bogenfürst, 2004). A lúdtojásban a keltetés 15. napjától önhőtermelés indul meg, vagyis a tojásokat drasztikusan hűteni kell. Ezért az 5. naptól naponta egyszer, a 16. naptól a bújtatásig naponta kétszer 20 perc időtartamra a keltetőgépet kinyitottam, és a tálcákon lévő tojásokat vízpermettel hűtöttem. A hűtés elmulasztása 20%-kal is ronthatja a keltethetőséget (Bogenfürst, 2004). A kelés várható ideje előtt két nappal a fejlődő, egészséges embriókat tartalmazó tojásokat a bújtatóba helyeztem át, ezzel egy időben a parafilmet óvatosan több helyen perforáltam, hogy elősegítsem a kelő kisliba megfelelő oxigénellátását, és megnöveltem a páratartalmat.

Az injektált tojásokat a keltetés 12. és 21. napján lámpáztam. Az elhalt embriókat tartalmazó tojásokat eltávolítottam a keltetőgépből. Ezt követően megállapítottam az elhalás idejét és lehetséges okát. Feljegyeztem az elhaláskori fejlődési stádiumot, valamint az esetlegesen fennálló bármilyen jellegű embriófejlődési rendellenességet. Az 5. napnál idősebb korban elhalt embriókból mintát vettem mikroszatellit marker alapú vizsgálathoz, amellyel a donor sejtek beépülését vizsgáltam. Amennyiben az embrió mérete lehetővé tette, külön mintát vettem az embrió ivarszervéből, a szívéből, az agyszövetből és a májából.

5.13. A lehetséges kimérizmus vizsgálata mikroszatellit marker analízissel

Az embriókból, valamint a különböző embrionális szervekből származó mintákon DNS vizsgálatot végeztem. Ennek célja a donor sejtek beépülésének sikeressége, valamint a donor sejtek embrión belüli arányának és eloszlásának vizsgálata volt. A mikroszatellit marker analízishez felhasznált agy, szív, máj és ivarszerv mintákat a kikelt állatokból, valamint a későbbi stádiumban elhalt embriókból gyűjtöttem. Csak azokat az elhalt embriókat vizsgáltam, amelyek elérték vagy meghaladták az embrionális fejlődés 10. napját. A DNS-t minden szövetből a már korábban leírt módon (Miller *et al.* 1988) izoláltam, baromfi szövetekre optimalizált protokoll szerint. A szöveteket 300 µl sejtmag lízis pufferben (2. melléklet), 10 µl (20 mg/ml) proteináz K enzim, valamint 10% SDS hozzáadásával inkubáltam. A továbbiakban a vérminták esetében használt, már korábban leírt DNS izolálási protokollt használtam.

Mindösszesen 191 mintát vizsgáltam és genotipizáltam melyekből 171 származott elhalt embriókból, a többi pedig a kikelt és leölt napos libákból vett minta volt. Azokat az egyedeket tekintetem kimérának, amelyek a PCR reakciót (3., 4. melléklet) követő poliakrilamid gélelektroforézis alapján tartalmazták a donor csoportból származó (155bp), valamint a recipiens állatoktól származó (159 bp) allélok egyaránt.

5.14. Kontroll kísérletek

Az injektálási módszer embriófejlődésre gyakorolt káros hatásainak vizsgálata céljából két kontroll kísérletet végeztem el, kísérletenként 100 termékeny lúdtojásan. Ezeket K1 és K2 kontroll csoportnak neveztem el.

A K1 kontroll csoport volt az úgynevezett „ablakos” kontroll csoport. Ebben a csoportban a tojások laterális oldalát és légkamra felőli végét Betadine oldattal (*Egis*) fertőtlenítettem, majd a légkamra felőli végen egy apró lyukat ütöttem, melyen keresztül steril injekciós fecskendővel 0,5 ml fehérjét szívtam le. Ezt követően a korábban fertőtlenített oldalon egy körülbelül 15 x 15 mm-es területen eltávolítottam a tojás héját és a héjhártyát. Ez után az „ablakot” parafilmmel visszazártam oly módon, hogy óvatos hevítéssel rátapadjon a megfelelő méretű darab a tojáshéjra és az „ablakot” lezárja. Keltetőgépbe helyeztem a tojásokat, majd a kelés várható időpontja előtt 2 nappal a parafilmet egy steril tű segítségével perforáltam. Minden tojás egyedi számozást kapott, továbbá feljegyzésre került a manipuláció pontos ideje, az inkubáció kezdete óta eltelt idő, továbbá, hogy az adott tojás melyik kísérleti csoportba tartozik. Ennek a kontroll csoportnak a célja az volt, hogy megvizsgáljuk az „ablak” nyitásának hatását az embriófejlődésre, egyéb manipuláció nélkül.

A K2 kontroll csoport volt az injektált kontroll, melynél a fentebb, a K1 csoport esetében már leírtak szerint elvégeztem a tojások fertőtlenítését, valamint a fehérje leszívását és az „ablak” nyitását. Mindezekon felül a K2 kontrollcsoport tojásaiban található embriók szívcsövébe 1-1,5 µl 5% Fast Green festékkel (*No. F-7252; Sigma-Aldrich*) jelölt steril DMEM oldatot (*No. D-5671; Sigma-Aldrich*) injektáltam. Az injektálást Narishige mikromanipulátorral (*MN 153; Narishige*), sztereomikroszkóp alatt (*MZ6; Leica*) végeztem el. Az intrakardiális injektálást követően az „ablakot” parafilmmel a már korábban leírt módon lezártam, és a kezelt tojásokat visszahelyeztem a keltetőgépbe. A K2 kontrollcsoportot az injektálás embriófejlődésre, túlélésre gyakorolt hatásainak vizsgálata céljából hoztam létre.

5.15. Statisztikai analízis

Statisztikai módszerekkel elemeztem a lúd embriók fejlődési szakaszainak megoszlását az inkubációs idő hosszának függvényében. Az egyes embrionális fejlődési szakaszok időbeni bekövetkezésének jellemzésére interquartilis tartományt (IQR) használtam. Az IQR érték azt az intervallumot jelöli, ahol az összes érték középső 50%-a helyezkedik el. A kísérleti csoportok összehasonlításához logisztikai regressziós modellt használtam, ahol mindkét kontroll csoport (K1, K2), valamint a kísérleti, blasztodermális sejtszuspenzióval injektált csoport (T) adatait páronkénti összehasonlításoknak vettem alá. Ezen módszer esetében az összehasonlításokat Tukey teszt (*Reiczigel et al. 2007*) segítségével végeztem. Az injektálás optimális idejének meghatározásához egy utas varianciaanalízist (ANOVA) használtam. Minden olyan esetben, ahol szignifikáns különbség volt, a három csoport eredményeinek összehasonlítására Fisher legkisebb szignifikáns differencia (LSD) tesztjét alkalmaztam. Minden kapott adatomat az R studio 0.99.489 verziószámú, valamint a Statistica 7.0 (*StatSoft Hungary Ltd*) programok segítségével értékeltem, $P < 0.05$ szignifikanciaszint mellett.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Az embriók fejlődésének vizsgálata és az injektálás optimális időszakának meghatározása magyar lúdban

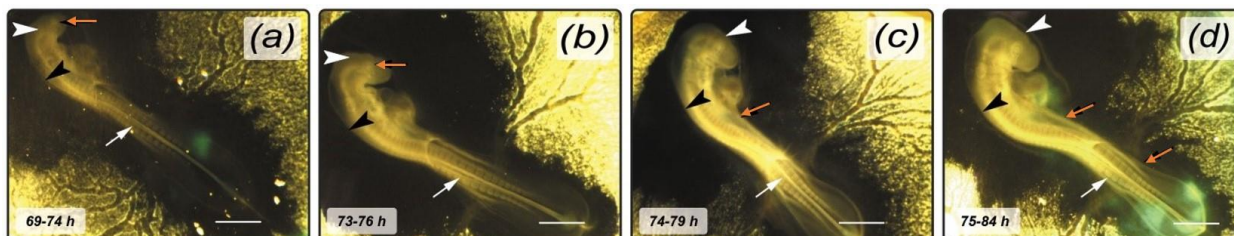
Első lépésként összehasonlító embriófejlődési vizsgálatokat végeztem, annak megállapítására, hogy a lúdembriók fejlődése hány óra keltetési idő után éri el a HH14-16 stádiumot, amikor az ősvarsejtek az embrió véráramában a legnagyobb koncentrációban vannak jelen. Statisztikai paramétereket (minimum, maximum, medián, alsó és felső kvartilis) határoztam meg (1. táblázat) az inkubációs idő adatokból az egyes fejlődési szakaszok megfelelő jellemzésére. Az IQR értéket (Interkvartilis terjedelelem) választottam annak leírására, hogy az egyes Hamburger és Hamilton féle fejlődési stádiumok a keltetés során jellemzően mikor figyelhetők meg a lúd fajban. A kapott eredményeket az 1. táblázatban összegeztem, a részletes eredményeket tartalmazó táblázat az M4 fejezetben szereplő 5. melléklet.

A Hamburger és Hamilton által leírt házityúk fejlődési stádiumoknak megfelelő lúd embriófejlődési szakaszok az eltelt inkubációs idő függvényében				
	HH 14	HH 15	HH 16	HH 17
Minimum (h)	60,0	60,0	60,0	63,0
Medián (h)	73,0	74,0	75,0	78,5
Maximum (h)	88,0	89,0	88,0	89,0
Interkvartilis terjedelelem (h)	68,8–74,3	63,0–76,0	74,0–79,0	75,0–84,0

1. táblázat: A lúd embriók Hamburger és Hamilton (1951) (HH) szerinti fejlődési szakaszainak megoszlása az inkubációs idő szerint:

A kapott adatok alapján az első injektálásra alkalmas HH14-es fejlődési stádiumot legkorábban 60 óra elteltével érheti el a lúdembrió, de még 88 óra keltetés után is találtam HH14-es stádiumú embriót. Az elvégzett statisztikai vizsgálatok szerint azonban **68,8 – 74,3** óra keltetési idő közé esik az az időintervallum, amikor a magyar lúd embrióinak jelentős része ebben a stádiumban található (közelítőleg 120/61). A következő, injektálásra alkalmas stádium a HH15-ös, szintén 60 óra elteltével már megtalálható volt a vizsgált embriók között (110/1), illetve 89 óra keltetési idő után is találtam egyet a vizsgált 110 db HH15-ös embrió között. Az interkvartilis terjedelelem ennél a fejlődési stádiumnál **63-76** óra közé esett (77/110). A HH16-os fejlődési stádium 134 embrió vizsgálata alapján szintén 60 óra elteltével már megtalálható (134/1 db), illetve 88 óra keltetés után még megtalálható (134/2 db) a fejlődő embriók között. Jellemzően azonban a **74-79** órák időtartamában figyelhető meg (134/70 db). A HH17-es fejlődési stádium 63 óra elteltével bukkant fel először (121/1) a vizsgált embriók között, és 89 óra elteltével még 7 darabot találtunk a 121 embrió között. Jellemzően azonban 75 és 84 óra közé esett az a keltetési idő intervallum, ahol előfordult (121/71 db).

Tehát vizsgálataim alapján a lúd embriók fejlődése **69-84** óra inkubálás után éri el (*1. táblázat; 16. és 17. ábra*) az embrionális sejtek bejuttatására optimális időszakot. A keltetésnek ebben a korai szakaszában azonban jelentős volt az egyedi eltérés az embrionális fejlődés sebességében (*17. ábra*).



16. ábra: A magyar lúd embriók injektálására optimális fejlődési stádiumok HH14 és HH17 között (Hamburger és Hamilton szerint, 1951) valamint az adott stádiumra jellemző fontosabb morfológiai tulajdonságok szemléltetése (méretarány: 1 mm).

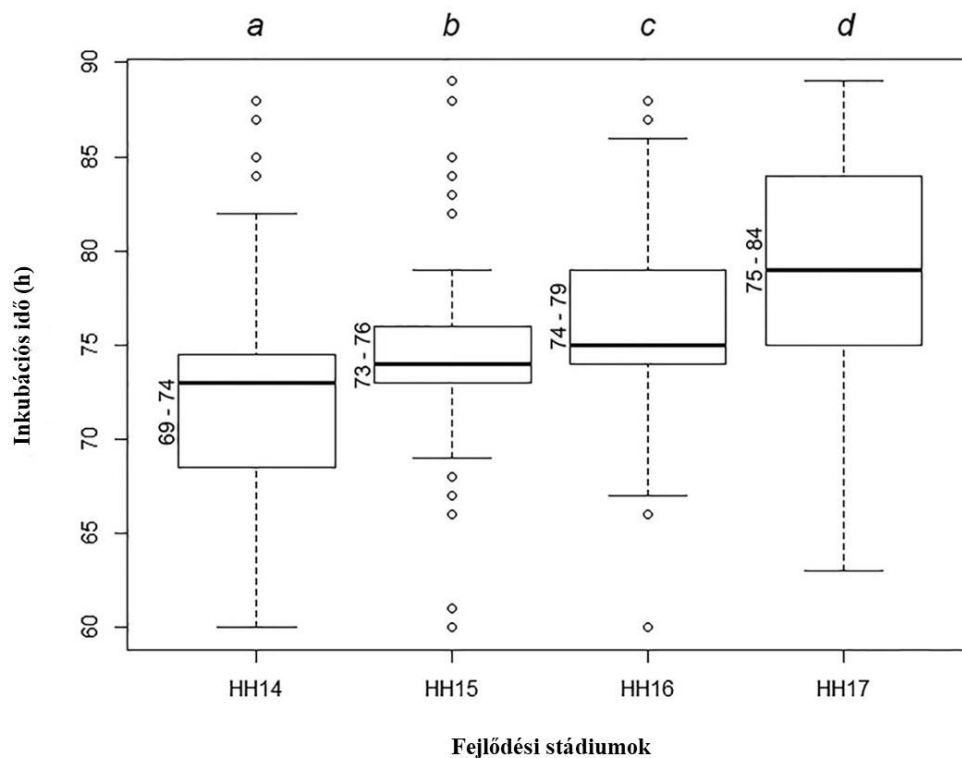
a: HH14 stádium (69-74 óra), az embrió 22 szomitával rendelkezik (fehér nyíl), a koponya hajlásszöge kb. 90° (fehér nyílhegy), a nyaki görbület széles (fekete nyílhegy), az elsődleges optikai vezikulum kezd betűrődni (narancssárga nyíl);

b: HH15 stádium (73-76 óra), 26 szomita (fehér nyíl), a koponya hegyes szöget zár be a törzzsel (fehér nyílhegy), a nyaki görbület széles (fekete nyílhegy), a szemserleg teljesen kialakult, az írisz régiójában különálló kettős kontúr látható. (narancssárga nyíl);

c: HH16 stádium (74-79 óra), ekkor az embriónak 28 szomitája van (fehér nyíl), minden görbület hangsúlyosabb (fehér és fekete nyílhegy), itt a szárnybimbó először megvastagodott gerincként jelenik meg (narancssárga nyíl);

d: HH17 stádium (75-84 óra), 32 szomita figyelhető meg (fehér nyíl), a nyaki görbület élesebben hajlított, de szöge még mindig nagyobb, mint 90° (fekete nyílhegy), először jelenik meg az epifízis (fehér nyílhegy), látható a szárny képződése és láb bimbó (narancssárga nyilak), a koponya görbülete változatlan.

Annak megerősítésére, hogy van-e összefüggés az embrionális fejlődési stádiumok és az eltelt inkubációs idő között, statisztikai próbákat végeztem (*17. ábra*), melyek eredménye az, hogy mérsékelt pozitív korreláció van az értékek között. Ennek oka feltehetően az, hogy nagy a heterogenitás az embriók fejlődése között, valamint a teljes állomány tekintetében is (*17. ábra*). Ez az őshonos fajtákra általánosan jellemző.



17. ábra: A vizsgált lúdembriók időbeli eloszlása a különböző fejlődési szakaszokban (A 16. ábrán látható Hamburger-Hamilton-féle fejlődési stádiumoknak megfelelő tethető fejlettségű lúdembriók).

A négyzetdiagramok leíró statisztikai paramétereket képviselnek, a dobozok az interkvartilis terjedelmet (IQR) mutatják, melyet az egyes szakaszok tipikus fejlődési időkereteinek jellemzésére alkalmaztam, a mediánt a dobozon belül található vízszintes vonal jelzi, a dobozok alatt és felett található bajuszok mutatják a tartományt (alsó-és felső kvartilis), a kiugró adatokat pedig a körök jelzik.

a: HH14: Min.: 60.0, Medián: 73.0, Max.: 88.0, IQR: 68.8-74.3;

b: HH15: Min.: 60.0, Medián: 74.0, Max.: 89.0, IQR: 63.0-76.0;

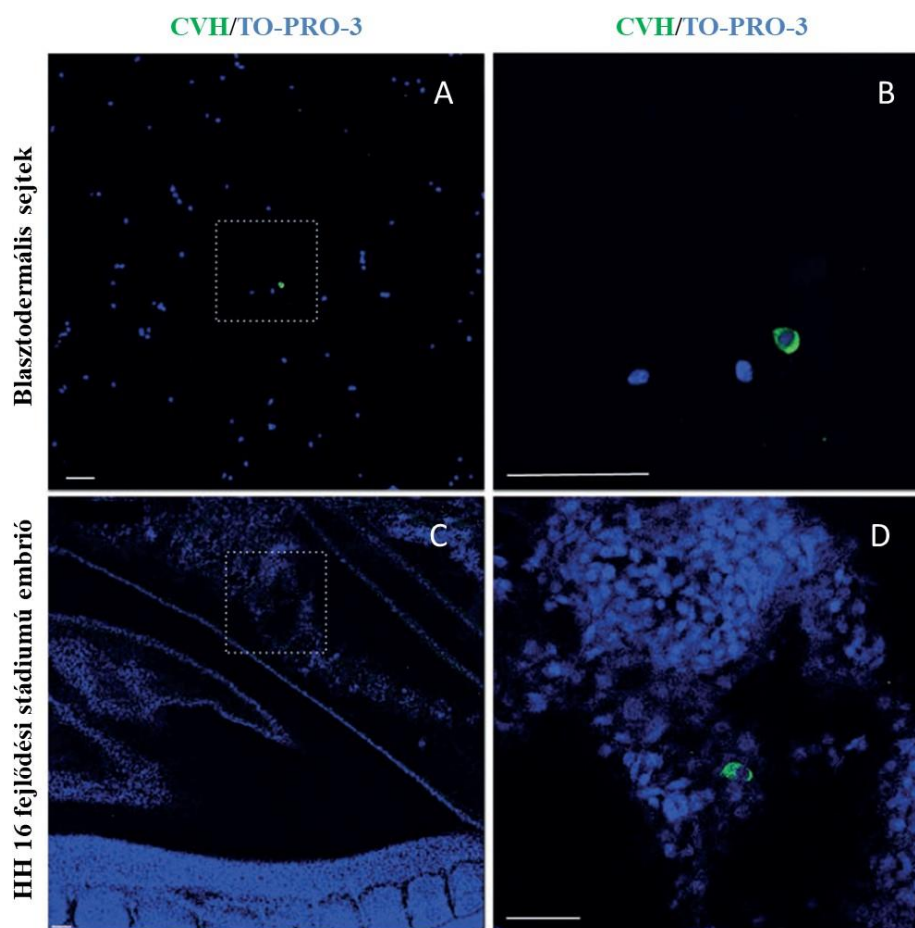
c: HH16: Min.: 60.0, Medián: 75.0, Max.: 88.0, IQR: 74.0-79.0;

d: HH17: Min.: 63.0, Medián: 78.5, Max.: 89.0, IQR: 75.0-84.0)

Az eredmények tükrében megállapítható, hogy az ekvivalens HH14-17 fejlődési stádium, mely szakaszban a PG sejtek vándorlása feltehetően bekövetkezik, lúd embriókban 69 és 84 órás inkubációs idők között fordul elő legnagyobb gyakorisággal. Ezen eredmények tükrében arra a megállapításra jutottam, hogy ez az időablak alkalmas lehet a blasztodermális sejtek véráramba injektálásával csíravonalas kiméra utódok létrehozására.

6.2. A lúd ősvarsejtek vándorlásának vizsgálata az embrióban immunfestéssel

A kísérlet tervezésekor sarkalatos pont volt az a hipotézis, hogy egyrészt a korai blasztodermális sejtek között található ősvarsejtek is, másrészt az, hogy a lúdembrióban is ugyanazokban a fejlődési stádiumokban történik az ősvarsejtek vándorlása az ivarszervek felé, mint a házityúknál. A 18. ábrán látható ősvarsejt-specifikus immunfestés bizonyította, hogy az általam kinyert lúd blasztodermális sejtuszpenzió tartalmaz ősvarsejteket, és a lúdembrióban ugyanazokban a fejlődési stádiumokban történik az ősvarsejtek vándorlása, mint a házityúknál. Ilyen irányú vizsgálatokat eddig nem végeztek lúd fajban.



18. ábra: Immunfestett primordiális őscsírasejtek (PGC) a blasztodermális sejtek között (A, B) és egy HH16-os stádiumú lúdembrió véráramában vándorlás közben (C, D).

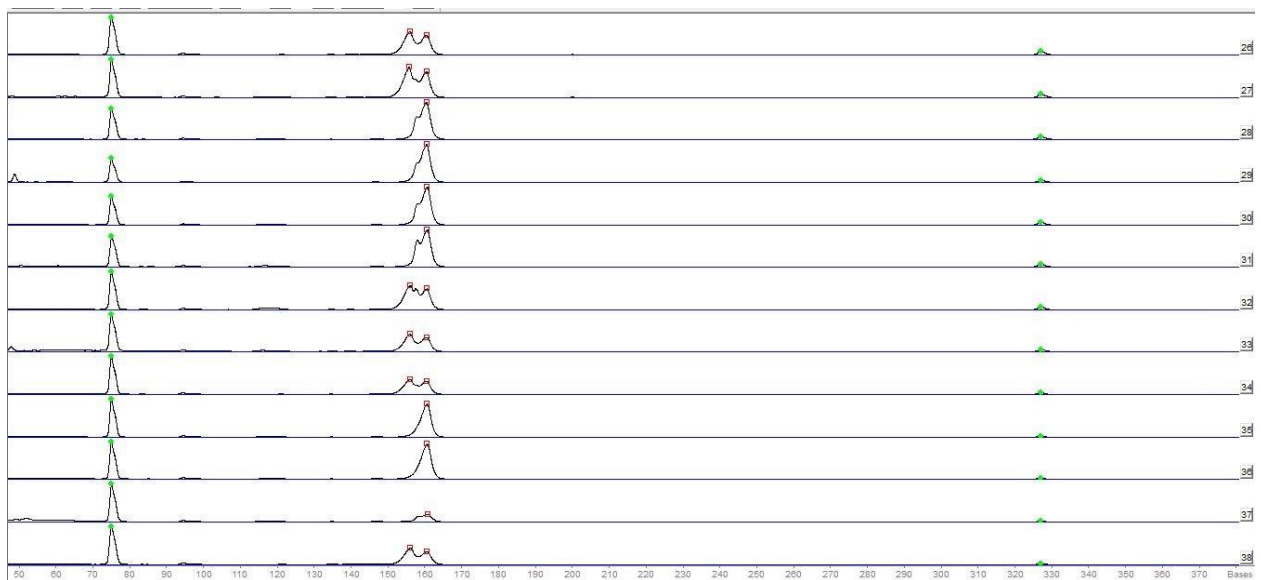
A fotókon csirke vasa homológ (CVH) pozitív PGC sejtek láthatók a blasztodermális sejtuszpenzióban (A, B) és egy HH16-os stádiumú lúd embrió extraembrionális régiójában (C, D). A B és D jelzésű fotók az A és C fotókon négyzettel bekeretezett területek nagyobb nagyítású képei. A sejtmagokat TO-PRO™-3-mal (*Thermo Fisher Scientific*) festettem. Méretarányok: 50 µm.

6.3. Az intrakardiális injektálás 3 napos lúd embrióba és az így elérhető kiméra előállítás hatékonysága

Munkám célja volt annak megállapítása, hogy az inkubálatlan, frissen tojt lúdtojásból gyűjtött blasztodermális, illetve korai PG sejtek megfelelő HH fejlettségű recipiens embrió véráramába injektálva eljutnak-e az embrió ivarszervébe és kolonizálják-e azt. Azaz, ha a recipiens embriót a fajnak megfelelő körülményeket biztosítva kikeltetjük, kimutathatók-e a donor genotípusú sejtek a recipiens embriókban, illetve kikelt állatokban. Az injektálási kísérletek során 249 egészséges, megfelelő fejlődési stádiumban lévő lúd embrió szívcsövébe injektáltam mikromanipulátor segítségével a korábban előkészített recipiens blasztodermális sejtuszuspenzióból 1-1,5 µl mennyiséget (megközelítőleg 600–800 sejt).

Az injektálást akkor ítéltam sikeresnek, ha az embrió elérte, illetve meghaladta fejlődésének 10. napját (2. táblázat). Az eddig az időpontig bekövetkező embrionális halálozást tekintettem a módszer közvetlen hatásának. Ezen kritériumok figyelembevételével a kezelt csoportban 83 embriót vizsgáltam mikroszatellit markerekkel, a kikelt kislibák száma 19 volt (2. táblázat).

A mikroszatellit marker analízist (19. ábra) összesen 171 mintán végeztem el, mivel a vizsgálatban részt vevő 83 embriónak külön-külön több szervét is vizsgáltam. Három embrióban találtam (egy 12 napos korban elhalt (D12), valamint 2 kikelt egyed, 3,6 %) a donor sejt vonal beépülésére utaló allélt az ivarszervekben (19. ábra). Továbbá találtam egy olyan, 13 napos inkubálást követően elhalt embriót, melynek agy- és szívizomszövet mintáiban is kimutattam a donor allélt. Így a kapott kiméra egyedek aránya **4,8%** volt (a 10 napos inkubációs időt meghaladóan is továbbfejlődött embriók számának tükrében). Donor sejteket is tartalmazó egyedeket találtam a 10 naposnál rövidebb inkubációs idő alatt elhalt embriók között is, de a fent már említett okokból kifolyólag ezeket nem számítottam sikeresnek a kísérlet szempontjából.



19. ábra: Mikroszatellit marker vizsgálat kromatogram eredményei:

27-es sor: Li148 számú minta egy D5 elhalt embrióból, 32-es sor: Li156A számú minta a D12 elhalt embrió agyszövetéből, 33-as sor: Li156B számú minta ugyanannak az elhalt embriónak az ivarszerv szövetéből, 34-es sor: Li157-es számú minta egy D4-es elhalt embrióból, a 26-os és a 38-as sor a standard.

Az injektálásokat 72 - 78 órás inkubálást követően hajtottam végre. Érdeemes megjegyezni, hogy az egyik kiméra a 73 órás (73 óra 44 perc) injektált csoportból, egy másik a 75 óra keltetés után injektált csoportból, kettő pedig a 76 órás inkubációt követően injektált csoportból került ki.

A kezelés optimális idejének meghatározása során mindkét kontrol csoportban a 75. órában végzett beavatkozás bizonyult szignifikánsan jobbnak a kísérlet szempontjából jónak minősített embriók arányát illetően. Ez az összefüggés a kísérleti csoportban nem volt szignifikáns.

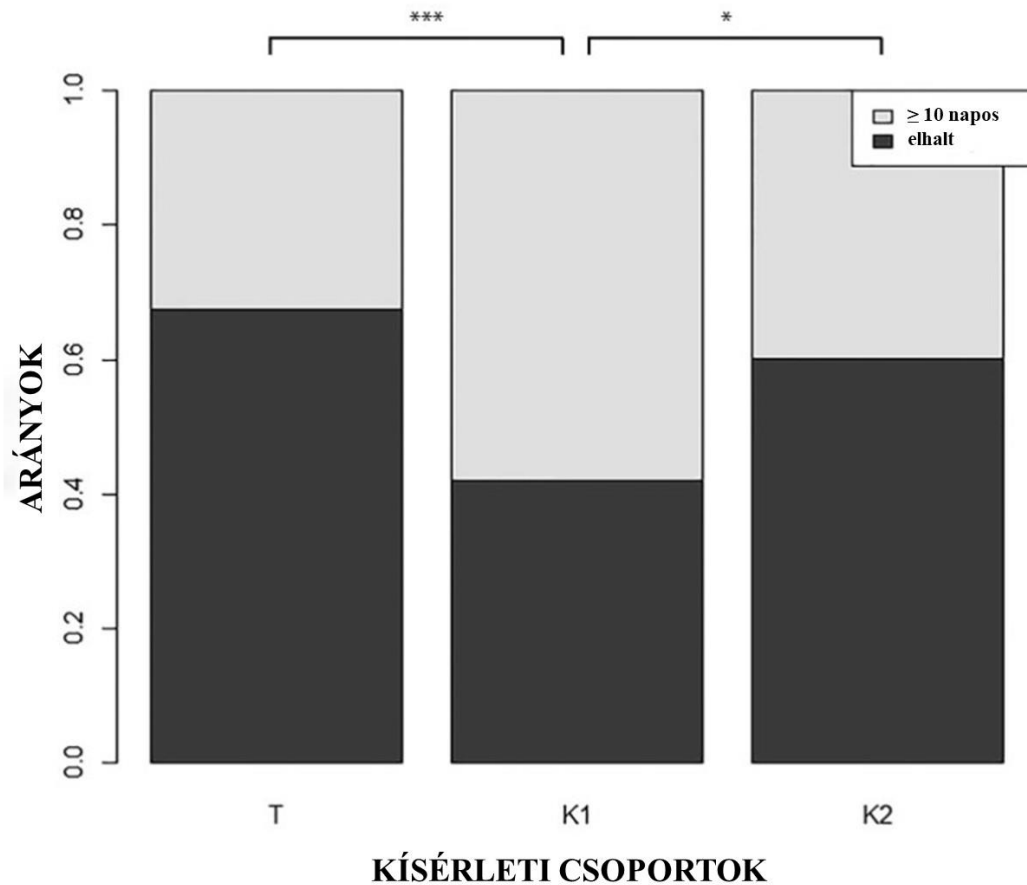
K1				K2							KÍSÉRLETI CSOPORT (T)		
INKUBÁCIÓ S IDŐ (h)	tojások száma	≥10 napos embriók száma	kikeltek száma	tojások száma	≥10 napos embriók száma	kikeltek száma	tojások száma	embriók száma	kikeltek száma	≥10 napos kimérák száma			
72	0	0	0	7	0	0	4	3	0	0			
73	9	3	2	38	10	3	35	9	2	1			
74	27	17	9	26	13	6	78	27	7	0			
75	41	29	22	14	10	6	64	21	6	1			
76	17	6	5	9	5	3	43	13	2	2			
77	6	2	1	6	2	2	23	8	2	0			
78	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0			
Összesen (db) (%)	100	57 (57%))	39 (39%))	100	40 (40%))	20 (20%))	249	83 (33,33%))	19 (7,63%))	4 (1,6%))			
% -os adatok a kísérleti csoportban a 10. inkubációs napot meghaladóan élő („jónak” tekintett) embriók számának függvényében								100%	22,9%	4,8%			

2. táblázat: A kísérleti adatok összefoglalása:

K1: Az „ablakos” kontrollcsoport, amelyben a tojánhéj és a héjmembrán eltávolításával 15x15 mm-es „ablakot” nyitottam a tojáson, majd az ablakokat dupla Parafilm réteggel lezártam, amelyet a kikelés előtt 2 nappal perforáltam; **K2:** Injektált kontrollcsoport, amelyben a recipiens embriók szívcsövébe az ablak létrehozása után 1–1,5 µl DMEM tápoldatot injektáltam. A kísérleti csoportba (T) tartozó embriókat blasztodermális sejtszuspenzióval injektáltam.

6.4. Az injektálás hatása a recipiens embriók mortalitására

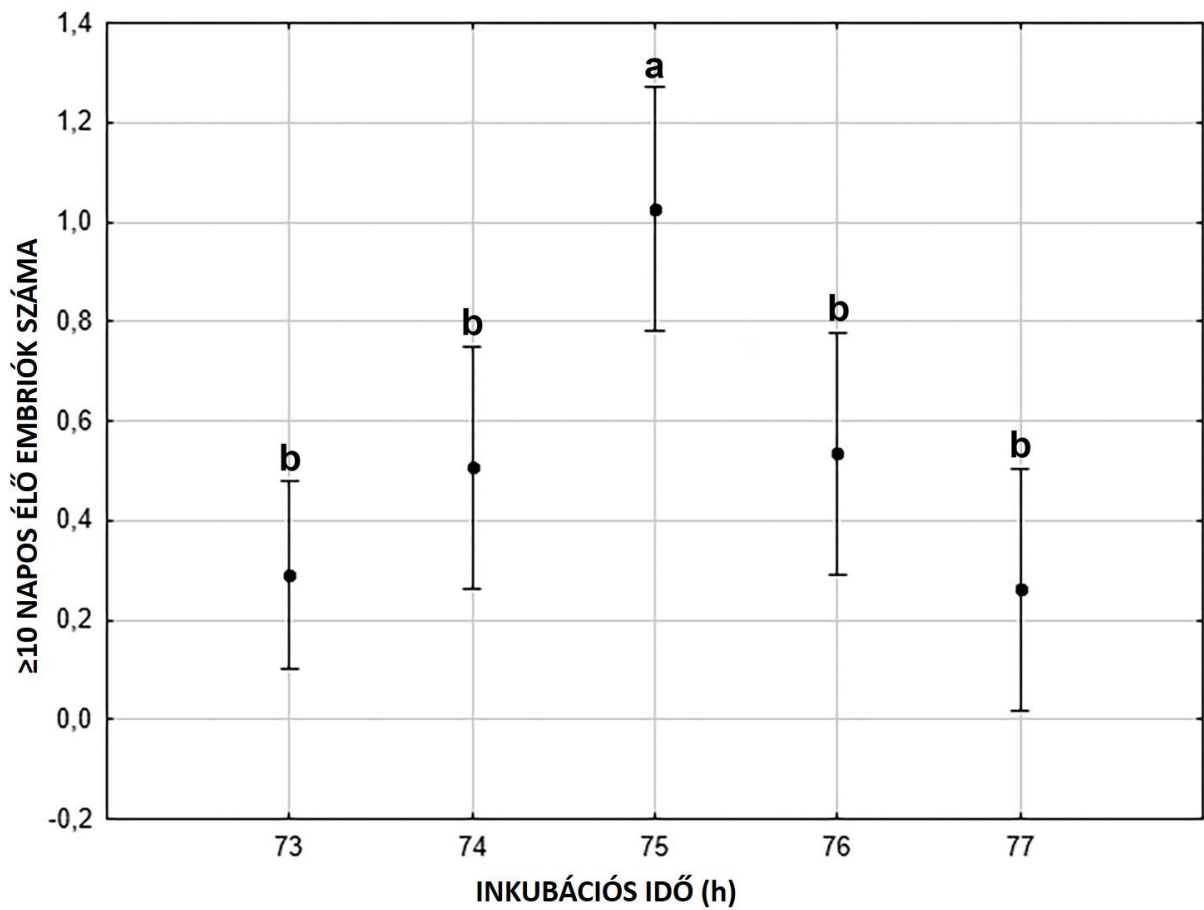
Összehasonlítva a K1 (57/100 és 39/100), illetve a K2 (40/100 és 20/100) kontrollcsoportokban az embrionális fejlettségi és a kelési arányokat az injektált (T) csoport eredményeivel (83/249 és 19/249), megállapítható, hogy a 10 napos inkubációs időt meghaladóan életben maradt és a kikelt kislibák száma az eljárás invazivitásának növekedésével csökkent (2. táblázat). Az elvégzett Tukey-teszt szignifikáns különbségeket mutatott a T és a K1 csoportok között ($P < 0.001$), valamint a K1 és a K2 kontroll csoportok között szintúgy ($P = 0.0288$), ellenben nem volt szignifikáns különbség sem a 10 napnál idősebb korban elhalt embriók számában, sem a kikelt kislibák arányában a T és a K2 csoport között. Ezen megfigyeléseim arra engednek következtetni, hogy a blasztodermális sejtek injektálása a csak festék injektálásához viszonyítva, nem növelte érdemben az embriók mortalitását (20. ábra).



20. ábra: Az embrionális elhalás mértéke a különböző kísérleti csoportokban

A **T** (Treated) a kezelt csoport, amelyben a 15x15 mm-es, tojánhéjon és héjhartán nyitott ablakon keresztül donor blaszodermális sejtszuszpenziót injektáltam a recipiens embriókba, majd dupla réteg parafilmmel zártam az ablakot. A **K1**, vagyis az „ablakos” kontroll csoport esetében csak a 15x15 mm-es „ablakot” nyitottam, ezt követően dupla réteg parafilmmel visszazártam, de nem injektáltam a tojásba. A **K2**, injektált kontroll csoport, mely csoport egyedeinek szívcsövébe az „ablak” nyitása után 1-1,5 µl DMEM tápoldatot injektáltam, ezt követően dupla parafilmmel zártam a nyílást. A kezelt (T) és a két kontroll csoport (K1, K2) mortalitási adatait logisztikus regresszióval, Tukey teszt segítségével hasonlítottam össze. Szignifikáns eltérés tapasztalható a kezelt (T) és a K1 kontroll csoport értékei között (**P < 0.001), és a két kontroll csoport adatai között (*P=0.0288)

A statisztikai számítások alapján manipuláció optimális ideje 75 óra inkubálás környékén van. Ebben az időszámban kaptam a két kontroll csoportban a legtöbb „jó” besorolású embriót (10 nap inkubálást túlélő embriók, 21. ábra), ez az összefüggés azonban nem volt szignifikáns a kísérleti (T, blaszodermális sejtszuszpenzióval injektált) csoport esetében. Mivel a kikelt kimérákat a 74–76 órás inkubálást követően injektált embriókból nyertem, ebben az időintervallumban várható a legnagyobb eséllyel a sikeres intracardialis injektálás.



21. ábra: Az élő embriók (≥ 10 nap) száma a különböző injektáláskori időcsoportokban (a; b: $P < 0,001$):

A nyers adatok Arcsin-transzformációját követően egy utas Anova és Fisher LSD módszereket alkalmaztam a lehetséges különbségek feltárására. Az elemzés szerint a 75 órás csoportban szignifikánsan több élő embrió volt, amely elérte a 10. embrionális fejlődési napot (az injektálást követően), mint bármely más csoportban. (Az X tengelyen lévő számok jelzik az inkubáció hosszát.)

7. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

7.1. Embriófejlődési vizsgálatok házilúd (*Anser anser domestica*) fajban

A házilúd őssejtekkel folytatott kutatások esetében az ovipozíciótól kezdődően történő, a házityúk HH embriófejlődési stádiumokhoz hasonlított embriófejlődési vizsgálatok kiemelten fontosak. Ezek a vizsgálatok nem csak faj, hanem akár fajta szinten is jelentősek, mivel egyrészt a házilúd kelési ideje jelentősen eltér a házityúkéétól, másrészt a tapasztalatok alapján – főként őshonos fajták esetében – akár egyedek szintjén is igen nagy variabilitást mutat. Tyúk fajban az ősvarsejtek jelenléte a keringési rendszerben a HH14-es stádiumban éri el a maximumát (50-53 órával a tojásrakást követően) (*Tajima et al. 1999*). A vándorló ősvarsejtek az intermedier mezoderma területén lépnek ki a keringésből, és kezdenek koncentrálni a HH15 – HH17 stádiumtól kezdődően (házityúkban 52-64 órával a tojásrakást követően) (*Nakamura et al. 2007*). Kutatásom szempontjából különösen jelentős ennek az úgynevezett „ablak periódusnak” a pontos időintervallumának a meghatározása, amikor az ősvarsejtek a véráramban vándorolnak. Feltételezésem szerint ez az időszak a tyúk fajjal azonos embrionális fejlődési stádiumokban következik be, azonban az időszak a hosszabb kelési idő miatt eltolódik. A kísérleteim megkezdésekor a vonatkozó szakirodalomban ennek az időszaknak a részletes vizsgálatára vonatkozó eredményeket nem találtam házilúd esetében.

Liptói (2005) leírta a házilúd embriófejlődését ovipozíciótól a kikelésig, azonban ez a vizsgálat nem a HH embriófejlődési stádiumokhoz hasonlítva mutatja be a lúdembrió keltetés közbeni fejlődését, hanem csak napokra lebontva.

Lukaszewicz és munkatársai (2017) inkubálatlan és 4, 8, 12, 16 órás inkubálást követően vizsgálták az embriófejlődést fehér koluda lúd fajtában a házityúk HH és EG&K stádiumaihoz viszonyítva az EG&K X. stádiumtól kezdődően. Munkájuk során arra az eredményre jutottak, hogy az inkubálatlan tojásból származó lúd embriók az EG&K X. és XI. stádiumban voltak. Megfigyeléseik alapján az egyedek már ekkor nagy szórást mutattak a fejlettség tekintetében. A 16 órás inkubáció elteltével az embriók fejlettsége HH2 - HH4 fejlettségi stádium közé esett. Eredményeik azt mutatják, hogy míg az inkubálatlan lúdtojásban az embrió fejlődési stádiuma hasonló a tyúkéhoz, a lúdembrió átmérője valamivel nagyobb. Az inkubációt követően a lúdembrió lassabban fejlődik, mint a csirkeembrió, az általuk vizsgált 16 órás inkubációs idő végéig. Ez a kutatás jóval részletesebben elemzi a házilúd korai embriófejlődését, azonban azt a periódust, amelyben az ősvarsejtek vándorlási csúcsa megfigyelhető a véráramban (HH14-17-nek megfelelő állapot) már nem vizsgálták. Azt azonban ez a kutatócsoport is megállapította, hogy fejlettség tekintetében nagy az eltérés fajtán belül a lúdembriók között már igen korai fejlődési stádiumban is.

Sellier és munkatársai (2006) számos madárfaj embriófejlődésének összehasonlítását végezték el az ovipozíciótól az inkubáció 72. órájáig, az EG&K valamint a HH fejlődési stádiumokat alapul véve. Az embriók fejlődését 6 óránként vizsgálták, kiindulásként 145 házityúk tojást vizsgáltak meg. Arra a megállapításra jutottak, hogy míg a tyúkembrió a megtojáskor EG&K X. stádiumban van, addig az általuk vizsgált landesi lúd EG&K XI. stádiumban. Hosszabb (28-30 napos) kelési ideje miatt a tyúkhöz viszonyítva az adott HH stádiumokat hosszabb inkubációs idő alatt éri el. Az én vizsgálataim szempontjából kiemelten fontos HH14-17 fejlődési szakaszt megfigyeléseik szerint a csirkeembriók átlagosan 48 és 60 órás inkubációs idő között, míg az általuk vizsgált 251 lúdembrió a HH14-16 fejlettséget 60 és 72 órás keltetési idő között éri el. Az általuk kapott adatok nagyságrendileg megfelelnek az általam kapottakkal, mely szerint az őshonos magyar lúd embriók többsége a HH14-17 stádiumnak megfelelő fejlettséget 68,8-84 órás inkubációs idő eltelte után éri el. Fontos különbség azonban a két vizsgálat között, hogy míg *Sellier* kutatócsoportja hat óránként vizsgálta a fejlettséget, én az inkubáció 60. órájától kezdve a 89. óráig 10 percenként monitoroztam az embriók fejlettségét, összesen 745 embriót megvizsgálva. További jelentős eltérés a két vizsgálat között, hogy őshonos fajok esetében az embriófejlődés üteme jelentős egyedi eltéréseket mutat, így méginkább indokolt volt ezt a vizsgálatot elvégezniem.

Li és kollégái (2019) a teljes embriófejlődést vizsgálták és hasonlították a tyúk HH embriófejlődési stádiumaihoz kacsza és lúd esetében, azonban nem az általam vizsgált *Anser anser domestica* (házilúd), hanem az *Anser cygnoides* (kínai hattyúlúd) faj embrióit vizsgálták. 600 lúdtojást vizsgáltak meg összesen, a keltetés első 72 órájában óránként vizsgálták az embriók fejlettségét, majd a harmadik naptól a tizedikig hat óránként. A kutatásom szempontjából fontos stádiumok tekintetében arra jutottak, hogy a HH13-as stádiumot 55-62, a 14-est 61-65, a 15-öst 63-69, a 16-ost 67-73, a HH17-es stádiumnak megfelelő fejlettséget pedig 71 és 86 órás inkubálási idő között érték el a hattyúlúd embriók, amely eredmények hasonlóak az általam kapottakhoz. Bár más lúdfajról van szó, a *Li* kutatócsoportja által elvégzett, az eddigieknél alaposabb és átfogóbb embriófejlődési vizsgálatok jó összehasonlítási alapnak bizonyulnak az én vizsgálataimhoz.

7.2. Új módszer kidolgozása a házilúd embrionális sejtek segítségével történő génmegőrzésére ivarszervi kiméra előállításával

A Természetvédelmi Világszövetség Vörös listáján összesen 11147 madárfaj szerepel, melyek 13,3%-a, azaz 1486 faj súlyosan veszélyeztetett, veszélyeztetett, vagy sebezhető kategóriákba sorolt (*IUCN Red List*). Az Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete (FAO) háziállatokkal kapcsolatos felméréseinek adatai alapján a 40 fajhoz tartozó közel 8800 bejegyzett fajta 7%-a már kihalt és további 24%-a kihalással fenyegetett (FAO 2019, <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/174199/>). A világon 3689 baromfi fajtát tartanak nyilván, melyek közül 2222 őshonos. Ezen fajták 28%-a veszélyeztetett, sebezhető vagy már kihalt (FAO, *DAD-IS*). Ezekből az adatokból látható, hogy a domesztikált baromfifajták és a vadmadár fajok jelentős része valamilyen kockázati kategóriába sorolható. Emiatt mielőbbi aktív cselekvésre és megfelelő védelmi stratégiákra van szükség, hogy a jelenleg tapasztalható folyamat lassíthatóvá, később megállíthatóvá váljon. Az őshonos baromfifajták értékes és ritka genetikai információjának megőrzése kiemelkedően fontos a mezőgazdasági biodiverzitás fenntartása szempontjából (Wang et al. 2017).

Hazánkban a lúdtenyésztés tradicionális, és gazdaságilag jelentős ágazata az állattenyésztésnek, ezért is fontos, hogy az őshonos magyar lúd genetikai állományát megőrizzük. Kutatómunkám során olyan módszert dolgoztam ki, amely lehetővé teszi a faj mindkét ivarának genetikai anyagának (W kromoszóma és a mitokondriális DNS) hosszútávú megőrzését. Tanulmányaim és kutatási munkám kezdetén (2012-ben) nagyon kevés kutatás foglalkozott madár ősvarsejtekkel, csak részleges eredmények születtek, azok is csak házityúk fajban. Intézetünkben régóta foglalkoztak blasztodermális sejtekkel történő génmegőrzési kutatásokkal számos madárfaj esetében, így ennek a módszernek a továbbfejlesztését tűztem ki célul a lúd fajra vonatkoztatva. Vizsgálataim során arra törekedtem, hogy ötvözzem a blasztodermális sejtek kinyerésének egyszerűségét az ősvarsejtek ivarszervekbe történő vándorlási képességének kihasználásával. Így egy új módszert fejlesztettem összejtek hatékony bejuttatására házilúd fajban.

Mivel a házilúd (*Anser anser domestica*) embrionális sejtjeinek felhasználásával a génmegőrzési kutatásokban nagyon kevés szakirodalom foglalkozik (mind blasztodermális sejtek, mind PG sejtek vonatkozásában), így a vizsgálataim során kapott eredményeket más madárfajok embrióin végzett, hasonló témájú vizsgálatokkal vetem össze.

Donor blasztodermális sejtek recipiens EG&K X. stádiumú recipiensbe történő injektálásával végzett kiméra-előállítási kísérleteket számos kutatócsoport végzett korábban több faj esetében is. Lúd fajban egyedül *Bednarczyk és munkatársai (Bednarczyk et al. 2003)* számoltak be donor blasztodermális sejtek injektálásáról recipiens EG&K X-XII stádiumú embriók szubgerminális üregébe, ahol a kezelt tojások 6,7%-a kelt ki, de a kikelték közül egyetlen állat sem bizonyult ivarszervi kimérának. Tyúk fajban *Carsience és kutatócsoportja (Carsience et al. 1993)* végeztek egy olyan vizsgálatot, ahol kezeletlen White Leghorn, és különböző dózisú γ sugárzással kezelt EG&K X. stádiumú recipiensbe injektáltak megközelítőleg 100, illetve 200-400 Barred Plymouth Rock termékeny donor tojásból származó blasztodermális sejtet. A szomatikus kimérizmust tollszín alapján, míg az ivarszervi kimérizmust a kikelt egyedek Barred Plymouth Rock-al történő visszakeresztezésével állapították meg. A csírvonalas kimérizmus gyakorisága körülbelül 100 donor sejt injektálását követően besugárzott recipiens alkalmazásával szignifikánsan ($P < 0,001$) magasabb volt (3/24 db, 12,5%), mint a kezelést nem kapott recipiensek esetében (2/106 db, 1,9%). Az injektált sejtek számának növelése nem volt hatással a kimérizmus gyakoriságára a nem besugárzott recipiensek esetében. Besugárzott recipiensbe 200-400 sejtet injektálva az ivari kimérizmus gyakorisága szignifikánsan ($P < 0,01$) 8/14-re (57,1%) emelkedett. Itt a kikelt egyedek számához viszonyították az ivarszervi kimérák arányát. Az ivarszervi és a szomatikus kimérák arányát használva az összehasonlítás alapjául, a csírvonalas kimérizmus gyakorisága szignifikánsan ($P < 0,01$) nőtt 3/14-re (21,4%) besugárzott recipiens és körülbelül 100 blasztodermális sejt injektálása esetén, és 2/21-re (9,5%) amennyiben nem besugárzott recipienseket alkalmaztak. A besugárzott recipiensbe 200-400 sejt injektálása szignifikánsan ($P < 0,01$) tovább növelte a sikerességet 8/12-re (66,7%). Összességében megállapították, hogy a besugárzás hatására az embriók némiképp elmaradtak a fejlődésben, elhúzódóbb kelést produkáltak, valamint az összes tojásból jelentősen alacsonyabb százalékban keltek ki, de a kikelték, valamint a szomatikus kimérák számát alapul véve nagyobb arányban voltak köztük ivarszervi kimérák, mint a kezeletlen recipiensek esetében. A nem besugárzott, összes kikelt egyedhez viszonyítottan kapott csírvonalas kiméra arány (**1,9%**) hasonlítható leginkább az általam kapott ivarszervi kiméra arányhoz, ahol a kikelt egyedek (19 állat) számához viszonyítva a kikelt egyedekből ivarszervi kiméra **10,52%** (2 egyed) lett. Tehát az általam kidolgozott fejlesztés, mely szerint a blasztodermális sejtsuszpenziót nem egy másik embrió blasztodermájának szubgerminális üregébe, hanem a 3 napos embrió szívcsövébe/véráramába injektálom, jelentősen megnövelte a kapott ivarszervi kimérák arányát. *Kino és munkatársai (1997)* friss, valamint fagyasztott-felolvasztott blasztodermális sejtekkel dolgoztak.

Megközelítőleg 500 db Barred Plymouth Rock fajtából származó blasztodermális sejtet injektáltak besugárzott EG&K X. stádiumú White Leghorn recipiens embriók szubgerminális üregébe. Az injektálást friss, valamint Percoll és Nycoprep grádiensen centrifugált fagyasztott-felolvasztott blasztodermális sejtekkel is elvégezték. A keltetést injektálás után az eredeti recipiens tojásnál 20-25 g-al nagyobb helyettesítő tojáshéjban végezték. A szomatikus kimérizmust szín alapján, az ivarszervi kimérizmust tesztkeresztezésekkel állapították meg. Friss blasztodermális sejtuszuspenzióval 59 recipiens injektálását végezték el, melyekből 24 állat kelt ki, ebből 22 volt szomatikus kimérának valószínűsíthető. A tesztkeresztezést 16 egyed esetében végezték el, ez alapján 9 bizonyult ivarszervi kimérának (az összes tesztkeresztezésbe vett egyed 56%-a). Fagyasztott-felolvasztott sejtek esetében alacsonyabb hatékonyságot értek el, de az összehasonlítás az én kísérletemmel ez esetben nem releváns, mivel én frissen kinyert blasztodermális sejtekkel dolgoztam. A kapott eredmények összevethetőségét nehezíti, hogy *Kino kutatócsoportja* besugárzott recipienseket alkalmazott, így a donor sejtek beépülésének esélye megnő, valamint a keltetés során másik, nagyobb tojáshéjba helyezték a fejlődő embriókat. Ezen felül a tyúk, mint kísérleti állat a lúddal szemben a manipulációkat jobban viseli, a keltetési körülményekre és különféle behatásokra jóval kevésbé érzékeny. *Li és munkatársai (2002)* interspecifikus kiméra létrehozására tettek kísérletet donor Maya kacsá és White Leghorn tyúk recipiens fajták felhasználásával. EG&K X. stádiumú recipiens tyúk embrió szubgerminális üregébe injektálták a donor eredetű kacsá blasztodermális sejteket. A kísérletet elvégezték egy 600 rad γ besugárzást kapott, 112 recipiens injektált egyedből álló (1-es) csoporton, valamint egy 121 recipiens egyedből álló, kezeletlen (nem besugárzott) kontroll csoporton (2-es). A kezelt csoportban 112 állatból 14 kelt ki (12,5%), a 13 napot meghaladóan fejlődött embriók és kikelt állatok közül tollszín alapján a testi kimérizmus 18 egyed esetében volt valószínűsíthető (16%), melyek közül azonban csak 4 állat (3,57%) kelt ki. A nem besugárzott kontroll csoport 121 egyedből 21 állat kelt ki (17,4%), 12 egyed (9,9%) esetében valószínűsítették a szomatikus kimérizmust tollszín alapján, melyek közül kikelt állat 7 egyed volt (5,78%), a többi kelés előtt elpusztult. A donorral történő visszakeresztezést követően arra a következtetésre jutottak, hogy mindössze egy hímivarú állat (**0,82%**) bizonyult ivarszervi kimérának, mely a kezeletlen csoportból került ki. Ez a kísérlet egyrészt rávilágít, hogy egy veszélyeztetett faj esetében fajok közötti kimérák létrehozásával is megvalósítható az eredeti faj visszanyerése, másrészt érdekes eredménnyel szolgál a besugárzással kezelt recipiensek kérdésében.

A keltethetőséget és a fejlődési erélyt a besugárzás egyértelműen rontja, mint azt korábbi vizsgálatokban is leírták, azonban itt az általuk kapott egyetlen ivarszervi kiméra egyed érdekes módon nem a besugárzott recipiensek csoportjából származott, habár korábbi kutatásokban javarészt olyan eredményeket kaptak, miszerint a recipiensek besugárzása növeli a kimérák (szomatikus és ivarszervi egyaránt) létrejöttének valószínűségét.

Jelenleg az ősvarsejtek hatékony, hosszútávú, ivarsejt létrehozó képességüket megőrizni képes sejtenyészetek fenntartása csak a házityúk fajban megoldott (*Van De Lavoie et al. 2006; Macdonald et al. 2010; Whyte et al. 2015; Oishi et al. 2016; Tonus et al. 2016; Kong et al. 2018*). Az egyéb madárfajokat illetően nagyon kevés a sikeres próbálkozás az ősvarsejtek tenyésztését és fenntartását illetően.

Lúd ősvarsejtek tenyésztésével és fenntartásával (*Doddamani, 2019*) egyetlen korábbi kutatás foglalkozik, azonban a módszer még fejlesztés alatt áll. Az ősvarsejteket az általuk fejlesztett szérumentes, BMP4 tartalmú médiumban három hónapot meghaladó ideig voltak képesek fenntartani, azonban a proliferációs ráta elmaradt a házityúk sejtenyészetek esetében tapasztaltaktól. Ebben a vizsgálatban nem végezték el a donor eredetű PG sejtek *in vivo* tesztelését sem, azaz a tenyészeteket csak proliferációs tesztekkel, génexpressziós vizsgálatokkal minősítették, nem végezték el a sejtek recipiensbe történő visszainjektálását.

Zebrapinty (*Taeniopygia guttata*) ősvarsejt vonalakat *Jung és munkatársai (Jung et al. 2019)* 30 napot meghaladó ideig voltak képesek tenyészetben fenntartani, táplálósejt réteg és magas FBS koncentráció (10 %) alkalmazásával. *Gessara és munkatársainak* célja egy táplálósejt mentes, minimális FBS tartalmú tenyésztő médium létrehozása volt a zebrapinty ősvarsejtek számára, a korai differenciálódás elkerülése miatt (*Gessara et al. 2020*). Az általuk alkalmazott körülmények között a sejtenyészetben 15-20 nap elteltével pusztulásnak indultak a sejtek. Az általuk *in vitro* tenyésztett, GFP-jelölt sejtekből körülbelül 500 darabot injektáltak a frissen tojt, termékeny recipiens tojások blasztodiszkjei alá. 22 injektált tojásból 10 egyed (45,4%) kelt ki vegyes ivarban (6 tojó és 4 hím), melyek mindegyikének gonádjában megtalálhatók voltak a donor eredetű, tenyésztett, GFP-jelölt ősvarsejtek.

Yakhkeshi és kutatócsoportja (2018) japán fűrj (*Coturnix japonica*) ősvarsejteket izoláltak HH13-15-nek megfelelő stádiumú embrió vérből, valamint HH28-30-nak megfelelő stádiumú embrió gonádjáiból. Ezeket a sejteket fűrj embrionális fibroblaszt táplálórétegen tenyésztették. 40-50 nap elteltével a vérből izolált PG sejtenyészetben a sejtek száma a 100-szorosára, míg a gonád-eredetű PG sejtek száma a 400-szorosára nőtt, így kísérleteikhez az utóbbiakat használták a továbbiakban. A sejtek proliferációs-és génexpressziós vizsgálatain túl migrációs és beépülési hatékonyságuk vizsgálatára 1000 db GFP+ ősvarsejtet injektáltak HH13-15 stádiumú recipiens embrió szívcsövébe.

A 310 embrióból a 6. inkubációs napon 59%-os túlélést, míg a 16. napon 34%-os túlélést tapasztaltak. A 6. napon élő embriók 16%-ában találták meg a GFP-t tartalmazó ősvarsejteket, a 16. napon még élő embrióknak pedig a 24%-ában. Ebből arra következtettek, hogy a tenyésztett PG sejtek normális vándorlási- és beépülési képességgel rendelkeznek.

Tagami és munkatársai (2017) megállapították, hogy az EG&K X. stádiumú (frissen tojt) házityúk embrió már tartalmaz korai PG sejteket, ennek analógiájára feltételeztem, hogy ez a lúd esetében is így van. Későbbi, immunfestéses vizsgálataim ezt a felvetést igazolták. Kísérletemben az összesen 249 db injektált recipiens embrióból 83 fejlődött a 10 napos inkubációs időt meghaladóan (33%). A továbbiakban a kísérlet szempontjából sikeres injektálásnak ezt az egyedszámot tekintettem. 83 egyedből 19 kikelt napos állatot kaptam (22,9%), valamint a 83 embrióból 4 embrióban sikerült kimutatnom a donor sejtek jelenlétét igazoló allélt (4,8%). Amennyiben a sikerességet a kikelt egyedszámra vetítem, az élő egyedek **10,52 %-a** bizonyult ivarszervi kimérának (2 db). Pontosan ilyen típusú kísérletet eddig egyetlen faj esetében sem végeztek, azonban *Gessara és munkatársai* zebra pintyen végrehajtott, szubgerminális üregbe történő PG sejt injektálási kísérlete mintegy a „fordítottja” az én vizsgálatomnak. A kelési arány náluk igen magas volt (45,4%, 22 állatból 10), de eleve kevés volt a kezelt embriók száma az én vizsgálatomhoz képest. Érdekes eredmény továbbá, hogy az összes kikelt egyed ivarszervében ki tudták mutatni a donor PG sejtek jelenlétét. Ők a ki nem kelt állatok tekintetében nem tettek közzé adatokat, ez esetleg nagyobb betekintést engedett volna a kísérlet sikerességébe, illetve mivel semmilyen más irodalmi forrás nem számol be 100 %-os ivarszervi kiméra arányról semmilyen faj vonatkozásában, ez némiképp megkérdőjelezi ezt az eredményt. Yakhkeshi kutatócsoportjának fürjekén végzett kísérletét összevetve az általam kapott eredményekkel arra a következtetésre jutottam, hogy bár ők tenyésztett PG sejteket injektáltak a recipiens embriók véráramába, a kísérletük során tapasztalt túlélés (a 6. napon 59%, a 16. napon 34%) hasonlóan alakult az általam 10 napot meghaladó inkubációs idő esetében tapasztalt túléléssel (33%), és itt már jóval nagyobb volt az injektált recipiens embriók száma is (310 egyed). A PG sejtek beépülése tekintetében jobb eredményeket értek el nálam (10 napos inkubációt túlélő egyedek 4,8%-a ivarszervi kiméra), azonban kikelt egyedről velem ellentétben nem számoltak be.

A kísérletem során alkalmazott új módszer azért működik hatékonyabban, mint az EG&K X. stádiumban kinyert, és ugyanebben a stádiumban a recipiens tojás szubgerminális üregébe visszainjektált blasztodermális sejtek alkalmazásán alapuló módszer, mert így a sejtek nem mozaikosan épülnek be testszerte, szomatikus kimérákat létrehozva, hanem jóval hatékonyabban kolonizálják a recipiens gonádokat, és így nagyobb arányban keletkeznek ivarszervi kimérák.

A lúd PG sejteknek megfelelő tenyésztőmédiüm fejlesztése, majd a sejttenyészetek hosszútávú, hatékony fenntartása az általam alkalmazott módszernél nehezebben kivitelezhető, költségigényesebb, és nagyobb munkaerő- és laborhátter igénye van. Következtetésképp az általam fejlesztett módszert - a frissen tojt tojásból kinyert, korai ősvarsejteket is tartalmazó blasztodermális sejtszuspenzió injektálását a HH14-17-nek megfelelő fejlettségű recipiens lúdembrió szívcsövébe – alkalmasnak találom az őssejtekkel történő génmegőrzés kivitelezésére lúd fajban.

7.3. Javaslatok

A lúd embriófejlődési vizsgálatokat érdemes lenne kiterjeszteni több lúdfajtára az EG&K X. stádiumtól kezdve a kikelésig, lehetőség szerint minél több embrió vizsgálatával, a fejlődés maximum óránkénti ellenőrzésével. Így létrehozható lenne egy adatbázis, mely alapján jobb képet kapnánk a fajták között fellelhető embrionális fejlődésbeni különbségekről. Hasznosnak ítélném továbbá az embriófejlődési vizsgálat komplexebbé tételét a tojások méretének, súlyának, illetve cikluson belüli megtojási idejének monitorozásával, mivel ezek az értékek összefüggenek a fejlődés sebességével. Ez a további kutatások szempontjából hasznos adat lehetne.

A módszer fejlesztését illetően javasolnám a felhasznált donor eredetű sejtek fluoreszcens jelölését, így vizsgálhatóvá válna vándorlásuk és letelepedésük a recipiens embrióban. Továbbá még egyszerűbbé tehető a módszer, ha az injektáláshoz szájpipettát alkalmazunk. A későbbiekben érdemes volna egy kísérletet elvégezni fagyasztott/felolvasztott őssejtek alkalmazásával is. Amennyiben kidolgozásra kerül a hosszútávú fenntartást lehetővé tevő lúd ősvarsejt-tenyésztő médiüm, a fenntartott sejtvonalak ivarsejt képző képességét mindenképpen tesztelni kell visszainjektálással is, melynek eredményei összevetésre kerülhetnének az általam kapottakkal.

A módszer felhasználását illetően javasolnám a hazai őshonos és termelő lúdfajták és vonalak embrionális sejtjeinek elhelyezését az Intézetünkben meglévő Génbankban. Ez nagy jelentőséggel bírna egyrészt, mert a lúdállományokat folyamatosan veszélyezteti a madárinfluenza fertőzés miatt történő hatósági leölés, ez minden évben bekövetkezik néhány tenyésztőnél. Másrészt a lúdentyésztők részéről igény merült fel arra vonatkozóan, hogy az éppen nem használt vonalaik genetikai anyagának fenntartása ne élő formában, hanem *in vitro* tárolással valósuljon meg. Ugyanis a lúd tartása rendkívül költséges, különösen akkor, ha semmilyen bevételt nem generál a tartás. Az őshonos fajták genetikai anyagának megőrzésének fontosságáról napjainkban elég sok szó esik, ennek részletes taglalása meghaladná a dolgozat kereteit. Azonban az Intézetünkben fenntartott őshonos magyar lúdállomány hímvarsejt, blasztodermális sejt és ősvarsejt mintái elhelyezésre kerültek a Génbankban.

8. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Meghatároztam, hogy a magyar lúd embriók a HH14-17 fejlődési stádiumot **69-84 óra** inkubálás után érik el. Ez az az időszak, amikor a leghatékonyabb az őssejtek bejuttatása.
2. Ősivarsejt-specifikus immunfestéssel igazoltam, hogy az EG&K X. stádiumú (frissen tojt) lúdtojásból kinyert blasztodermális sejtszuspenzió tartalmaz ősivarsejteket (PGC) is.
3. Ősivarsejt-specifikus immunfestéssel igazoltam, hogy a 69-84 órát inkubált embrió véráramában megtalálhatóak a vándorló ősivarsejtek.
4. Kidolgoztam egy új kiméra előállítási módszert, a blasztodermális sejtek intrakardiális injektálását 3 napos embrió szívcsövébe, amely költséghatékony, és nem igényel nagyon bonyolult és drága labor felszereltséget. Megállapítottam, hogy az injektálás optimális időszaka lúd fajban **74-76 óra** inkubációs idő közé tehető.
5. Az általam kidolgozott módszer segítségével ivarszervi kiméra egyedeket állítottam elő magyar lúd fajtában, a kimérizmust molekuláris genetikai markerek segítségével igazoltam.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Hazánkban a lúdtenyésztés és -tartás tradicionálisan fontos mezőgazdasági ágazat, ezért szükséges volt egy egyszerűen alkalmazható, hatékony génmegőrzési eljárás kidolgozása mind az őshonos, mind az értékes genetikai anyaggal rendelkező kereskedelmi vonalak tekintetében. Fontos szempont volt, hogy a nőivar (mint minden madárfaj esetében) a heterogametikus ivar, így a W kromoszóma, valamint a mitokondriális DNS genetikai anyaga csak a nőivar génmegőrzésbe történő bevonásával oldható meg. Erre madarak esetében megoldást kínál a különböző típusú őssejtek tárolása, majd azok recipiens egyedekbe történő beültetésével ivarszervi kiméra egyedek létrehozása. Ezen egyedek egymással, vagy a donor fajtával történő visszakeresztezésével visszanyerhető a kívánt genotípus. Mivel a lúd faj több szempontból is problémás kísérleti állat, ezért nagyon kevés kutatási eredmény található a vonatkozásában.

Vizsgálataim során megállapítottam, hogy a magyar lúd fajta embriói a HH14-17 közötti fejlettségi stádiumot **69-84** óra inkubálás után érik el. Immunfestéssel igazoltam, hogy ebben az időszakban történik az ősvarsejtek vándorlása a véráramban, hogy a fejlődő gonádokat kolonizálják. Amennyiben ebben az időintervallumban őssejteket injektálunk a véráramba, azok nagyobb eséllyel képezhetnek ivarszervi kimérákat. Két, különböző mikroszatellit markereket homozigóta formában tartalmazó kísérleti csoportot képeztem a lúd állományokból. A recipiens csoport frissen megtojt tojásainak blasztodermáiból blasztodermális sejtuszuspenziót készítettem, melyben immunfestéssel igazoltam korai PG sejtek jelenlétét. A sejtuszuspenzióból megközelítőleg 600-800 blasztodermális sejtet injektáltam a megfelelő fejlődési stádiumban lévő recipiens embrió szívcsövébe. Vizsgáltam az általam végzett beavatkozások lehetséges káros hatásait két különböző kontrollcsoport beállításával. Létrehoztam négy, mikrosatellit markerekkel igazolt kiméra egyed, melyek közül három ivarszervi, egy egyed pedig szomatikus kiméra volt. Így a tíz napot meghaladóan fejlődő embriók számához (83 db) viszonyítva a kiméra egyedek aránya **4,8%** volt (4 db), a kikelt egyedek (19 db) számához viszonyítva pedig **10,52%** (2 db). Vizsgálataim a lúd faj tekintetében úttörőek. Ivarszervi kiméra lúd előállításáról más kutatócsoportok esetében nincs tudomásom.

Munkám során kidolgoztam egy hatékonyan alkalmazható új, egyszerű, költségkímélő génmegőrzési módszert, mely alkalmas mind az őshonos, mind az értékes kereskedelmi lúdfajták tekintetében a genetikai anyag biztonságos megőrzésére, és a kívánt genotípus visszanyerésére.

10. SUMMARY

In Hungary, the goose breeding and production is traditionally important agricultural sector, so it was necessary to develop an easy-to-apply, efficient gene conservation procedure for both native and commercial lines of high genetic value. An important aspect was that females (in all bird species) are heterogametic, thus, the W chromosome as well as the mitochondrial DNA can only be preserved by conserving the female genotype. In the case of birds, the solution is to store different types of stem cells and then create germline chimeric individuals by transplanting them into a recipient individuals. The original genotype can be regained by crossing these individuals with each other or by back-crossing with the donor species. Geese are problematic in several aspects as experimental animals, therefore regarding this species, only a few previous researches can be found.

I established that the embryos of the Hungarian goose reach the developmental stage between HH14-17 after 69-84 hours of incubation. Stem cells migrate in bloodstream during this period to colonize developing gonads, which was proven by immunostaining. If stem cells are injected into the bloodstream in this time interval, they are more likely to form germline chimeras. Two experimental groups of goose flocks containing two different microsatellite markers in homozygous form were created. A cell suspension was prepared from the blastoderms of freshly laid eggs of the recipient group, in which the presence of early PG cells was confirmed by immunostaining. Approximately 600-800 blastodermal cells from the cell suspension were injected into the heart of the recipient embryo at the appropriate developmental stage. I examined the possible side effects of the procedure by setting up two control groups. Four chimeric geese were created, which was proven by microsatellite markers. Three of them were germline chimeras and one was a somatic chimera. Thus, the proportion of chimeric individuals compared to the number of embryos developing for more than ten days (83) was 4.8% (4), and 10.52% (2) compared to the number of hatched individuals (19). My research on the goose species is pioneering, because I have no knowledge of the production of germline chimeric geese in other research groups.

A new, simple, cost-effective gene conservation method that can be used to safely preserve genetic material for both native and valuable commercial goose species and to recover the desired genotype have been developed.

11. MELLÉKLETEK

11.1. M1. IRODALOMJEGYZÉK:

AGATE, R., SCOTT, B., HARIPAL, B., LOIS, C., NOTTEBOHM, F. (2009): Transgenic songbirds offer an opportunity to develop a genetic model for vocal learning. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:17963–7. p. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0909139106>

AIGE-GIL, V., & SIMKISS, K. (1991): Sterilisation of avian embryos with busulphan. In: *Res Vet Sci*. 50, 139–44 p. DOI: 10.1016/0034-5288(91)90096-7

AIRE, T. A., AND OZEGBE, P. C. (2007): The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. In: *Journal of anatomy* vol. 210,6 731-40. p. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2007.00726.x

ARLT, D., BENSCH, S., HANSSON, B., HASSELQUIST, D., AND WESTERDAHL, H. (2004): Observation of a ZZW female in a natural population: implications for avian sex determination. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 271 (Suppl. 4), S249–S251. p. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0155

ARNOLD, A. P., ITOH, Y., AND MELAMED, E. (2008): A bird's-eye view of sex chromosome dosage compensation. In: *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9, 109–127. p. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164220

BAILE C. A. (2000): Commercialization of biotechnology in agriculture. In: *Abstract of the American Dairy Science Association conference, American Society of Animal Science*, July 24-28, Baltimore, Maryland. 20.

BAKER, S. F., LEDWITH, M. P. AND MEHLE, A. (2018): Differential splicing of ANP32A in birds alters its ability to stimulate RNA synthesis by restricted influenza polymerase. In: *Cell Rep*; 24: 2581–2588. p. e4 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.012>

BAKST, M. R., WISHART, G. J., BRILLARD, J. P. (1994): Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. In: *Poult. Sci. Rev.* 5:117-143. p.

BAKST, M. R., DONOGHUE, A. M., YOHO, D. E., MOYLE, J. R., WHIPPLE, S. M., CAMP, M. J., LIU, G. Q. AND BRAMWELL, R. K. (2010): Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation¹ In: *Poult. Sci.* 89: 986-992. p. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00481>

BÁLDY, B. (1954). A baromfi tenyésztése. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

BEDNARCZYK, M., LAKOTA, P., GRAJEWSKI, B. (2003): Evaluating survival chances of duck and goose embryos injected into the subgerminal cavity with blastodermal cells of donors. / Ocena przeżywalności zarodków kaczych i gęśich po iniekcji do jamy podzarodkowej komórek blastodermalnych dawców. In: *Med Weter.* 59(6) 521-524. p.

BESSEI, W. (1989): Preservation of local poultry stocks. In: *Genotype X environment interactions in poultry production. Report of a meeting, Colloques de l'INRA. 9-11 May 1989. Jouy-es-Josas, France*, 50.:175-188. p.

BIRKHEAD, T. R., AND MOLLER, A. P. (1992): Numbers and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: A comparative study. In: *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 45:363–372. p. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1992.tb00649.x>

BISZKUP, F., AND BEKE, L. (1951): A magyaróvári sárga magyar tájfajta tyúk kitenyésztésének módszerei és eredményei. In: *Agrártudomány* III:461–467. p.

BLESBOIS, E. (2007): Current status in avian semen cryopreservation. In: *World Poult. Sci. J.* 63:213–222. p. DOI: 10.1017/S0043933907001419

BOGENFÜRST, F. (2004) A keltetés kézikönyve. Gazda Kiadó. Budapest. 278 p.

BOSSELMAN, R. A., HSU R. Y., BOGGS, T., HU, S., BRUSZEWSKI, J., OU, S., ET AL. (1989): Germline transmission of exogenous genes in the chicken. In: *Science.*;243:533–5. p. DOI: 10.1126/science.2536194

BRESLER, M., BENHAM, J., LUKE, G. & SIMKISS, K. (1994): Manipulations of germ cell populations in the gonad of fowl. In: *Br Poult Sci.* 35, 241–47. p. DOI: 10.1080/00071669408417688

BRILLARD, J.P. (1993): Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. In: *Poult. Sci.* 72: 923-928. p. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0720923>

- BUCHHOLZ, W. G., PEARCE, J. M., PIERSON, B. J., AND SCRIBNER, K. T. (1998): Dinucleotide repeat polymorphisms in waterfowl (family Anatidae): characterization of a sex-linked (Z-specific) and 14 autosomal loci. In: *Anim. Genet.* 29, 323–325. p. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.1998.00247.x>
- CARSIENCE, R. S., CLARK, M. E., VERRINDER GIBBINS, A. M. & ETCHES, R. J. (1993): Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells & compromised recipient embryos. In: *Development* 117, 669–675. p. DOI: 10.1242/dev.117.2.669
- CHALAH, T., SEIGNEURIN, F., BLESBOIS, E., AND BRILLARD, J. P. (1999): In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. In: *Cryobiology* 39:185–191. p. DOI: 10.1006/cryo.1999.2201
- CHALLITA, P. M., KOHN, D. B. (1994): Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 91:2567–71. p. DOI: 10.1073/pnas.91.7.2567
- CHAMBERS, I., COLBY, D., ROBERTSON, M., NICHOLS, J., LEE, S., TWEEDIE, S., SMITH, A. (2003): Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor In: *Embryonic Stem Cells. Cell*, 113, 643–655. p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)
- CHAPMAN, S.C., LAWSON, A., MACARTHUR, W. C., WIESE, R. J., LOECHEL, R. H., BURGOSTRINIDAD, M., ET AL. (2005): Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. In: *Development.*;132:935–40. p. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.01652>
- CHOI, J. W., KIM, S., KIM, T. M., KIM, Y. M., SEO, H. W., PARK, T. S., JEONG, J. W., SONG, G., AND HAN, J. Y. (2010): Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. In: *PLoS One* 5: e12968. p DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012968.g004>
- CLINTON, M. (1998): Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. In: *Journal of Experimental Zoology* 281, 457–465. p. doi:10.1002/(SICI)1097-010X (19980801)281:53.CO;2-6

CLULOW J. AND JONES, R. C. (1982): Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese Quail *Coturnix coturnix*. In: *J. of Reprod. and Fertil.* 64: 259-266. p. DOI: 10.1530/jrf.0.0640259

COLE, L. J. AND HOLLANDER, W. F. (1950): Hybrids of pigeons by ringed dove. In: *Amer. Naturalist.* 84, 275–308. p

COLLARES, T., CAMPOS, V. F., DE LEON, P. M., CAVALCANTI, P. V., AMARAL, M. G., DELLAGOSTIN, O. A., ET AL. (2011): Transgene transmission in chickens by sperm-mediated gene transfer after seminal plasma removal and exogenous DNA treated with dimethylsulfoxide or N,N-dimethylacetamide. In: *J Biosci.*;36:613–20. p. DOI: 10.1007/s12038-011-9098-x

CONG, L., RAN, F. A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., ET AL. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. In: *Science*; 339: 819. p. DOI: 10.1126/science.1231143

CSORBAI, A., FODOR, Z., KRISTÓF, B., LÁTITS, M., MOLNÁR, GY. (2019): A magyar baromfiágazat helyzete 2019 első háromnegyed évében In: *Baromfiágazat* 19. évf. 2019/4., 14-22.p.
https://mbtt.hu/szakmai_anyagok/agazati_cikkeink/a_magyar_baromfiagazat_helyzete_2019_elo_haromnegyedevében

DALLA-FAVERA, R., BREGNI, M., ERIKSON, J., PATTERSON, D., GALLO, R. C., CROCE, C. M. (1982): Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7824–7827. p. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7824>

DAVISON, T.F. (2003): The immunologists' debt to the chicken. In: *Br Poult Sci*; 44: 6–21. p. DOI: <https://doi.org/10.1080/0007166031000085364>

DIMITROV, L., PEDERSEN, D., CHING, K. H., ET AL. (2016): Germline gene editing in chickens by efficient CRISPR-mediated homologous recombination in primordial germ cells. In: *PLOS One*; 11: e0154303. p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154303>

DODDAMANI, D. (2019): The transcriptome analysis of Primordial Germ Cells of birds. PhD thesis of Doctor of Philosophy The University of Edinburgh, <https://era.ed.ac.uk/handle/1842/37496>

DRIESCH, H. (1891): "Entwicklungsmechanische Studien: I. Der Werthe der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermenentwicklung. Experimentelle Erzeugung von Theil- und Doppelbildungen. II. Über die Beziehungen des Lichtes zur ersten Etappe der thierischen Formbildung." In: *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 53 160–84. p.

EDDY, E. M. (1975): Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. In: *Int. Rev. Cytol.*;43:229–80. p. DOI: 10.1016/s0074-7696(08)60070-4

ELLEGREN, H. (2000): Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. In: *Trends in Ecology & Evolution* 15, 188–192. p. doi:10.1016/S0169-5347(00)01821-8 DOI: 10.1016/s0169-5347(00)01821-8

ELLEGREN, H., HULTIN-ROSENBERG, L., BRUNSTROM, B., DENCKER, L., KULTIMA, K., AND SCHOLZ, B. (2007): Faced with inequality: chicken do not have a general dosage compensation of sex-linked genes. In: *BMC Biology* 5, 40. p. DOI: 10.1186/1741-7007-5-40

ETCHES, R. J., CLARK, M. E., TONER, A., LIU, G. AND GIBBINS, A. M. (1996): Contributions to somatic and germline lineages of chicken blastodermal cells maintained in culture. In: *Mol Reprod Dev.* 45, 291–98. p. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199611)45:3<291::AID-MRD5>3.0.CO;2-N

EYAL-GILADI, H. AND KOCHAV, S. (1976): From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table & a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. In: *Dev. Biol.* 49, 321–337. p. DOI: 10.1016/0012-1606(76)90178-0

EYAL-GILADI, H., GINSBURG, M., FARBAROV, A. (1981): Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. In: *J Embryol Exp Morphol.*;65:139–47. p. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.65.1.139>

EVANS, M. J., KAUFMAN, M. H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In: *Nature*; 292: 154–6. p. DOI: <https://doi.org/10.1038/292154a0>

FAO (2019): <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/174199/>

FAO, DAD-IS, <http://www.fao.org/3/CA0121EN/ca0121en.pdf>

FRASER, R. A., CARSIENCE, R. S., CLARK, M. E., ETCHES, R. J. & GIBBINS, A. M. (1993): Efficient incorporation of transfected blastodermal cells into chimeric chicken embryos. In: *J Dev Biol.* 37, 381–85. p.

GESSARA, I., DITTRICH, F., HERTEL, M., HILDEBRAND, S., PFEIFER, A., FRANKL-VILCHES, C., MCGREW, M., GAHR, M. (2020): Highly efficient genome modification of cultured primordial germ cells with lentiviral vectors to generate transgenic songbirds. In: *Stem Cell Rep.* 16, 1–13. p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.02.015>

GHIGI, A. (1936): Galline di faraone e tacchini. In: *Ed. Ulrico Hoepli*, Milano.

HAMBURGER, V., AND HAMILTON, H. L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. In: *Dev. Dyn.* 195:231–272. p. DOI: [10.1002/aja.1001950404](https://doi.org/10.1002/aja.1001950404)

HANEBRINK, E. L. (1973): Characteristics and behaviour of a peafowl-guinea hybrid. In: *Game Bird Breeders, Aviculturists, Zoologists and Conservationists. Gazette.* 22, 8–11. p.

HARVEY, A. J. AND IVARIE, R. (2003): Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. In: *Poult Sci*; 82: 927–930. p. DOI: [10.1093/ps/82.6.927](https://doi.org/10.1093/ps/82.6.927)

HAYASHI, K., SAITOU, M. (2012): Generation of Functional Primordial Germ Cells from Pluripotent Stem Cells. In: *J. Mamm. Ova Res.*, 29, 2–10. p. DOI: <https://doi.org/10.1274/jmor.29.2>

HELLMICH, R., SID, H., LENGYEL, K., ET AL. (2020): Acquiring resistance against a retroviral infection via CRISPR/Cas9 targeted genome editing in a commercial chicken line. In: *Front Genome Ed. Epub ahead of print 28 May.2020.* DOI: [10.3389/fgeed.2020.00003](https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.00003).

HÉJJA, I., VÁRKONYI, E., ZÖLDÁG, L., AND BARNA, J. (2006): A mesterséges kimériszmus jelentősége baromfiban In: *Magy. Állatorvosok Lapja* 1. Rész. Irodalmi áttekintés. 273-280 p.

HUGHES, G. C. (1963): The population of germ cells in the developing female chick. In: *J Embryol Exp Morphol.*;11:513–36. p. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.11.3.513>

ILLMENSEE, K., MAHOWALD, A. P. (1974): Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.*;71:1016–20. p. DOI: [10.1073/pnas.71.4.1016](https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1016)

ITOH, Y., MELAMED, E., YANG, X., KAMPF, K., WANG, S., YEHYA, N., VAN NAS, A., REPLOGLE, K., ET AL. (2007): Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. In: *Journal of Biology* 6, 2. p. doi:10.1186/jbiol53 DOI: 10.1186/jbiol53

JACOB, M., AND BAKST, M. R. (2007): Development anatomy of the female reproductive tract. In: *Reproductive Biology and Physiology*, Vol. 6a. (B. G. M. Jamieson, ed). USA: Science publishers. 149–179. p.

JAHNER, D., STUHLMANN, H., STEWART, C. L., HARBERS, K., LOHLER, J., SIMON, I., ET AL. (1982): De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. In: *Nature*.;298:623–8. p. DOI: 10.1038/298623a0

JUNG, K. M., KIM, Y. M., KEYTE, A. L., BIEGLER, M. T., RENGARAJ, D., LEE, H. J., MELLO, C. V., VELHO, T. A. F., FEDRIGO, O., HAASE, B., JARVIS, E. D., HAN, J. Y. (2019): Identification and characterization of primordial germ cells in a vocal learning Neaves species, the zebra finch. In: *FASEB J* 33(12):13825-13836. p. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.201900760RR>

KARAGENÇ, L., GINSBURG, M., EYAL-GILADI, H., ET AL. (1996): Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. In: *Dev Genet*.;19:290–301. p. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6408(1996)19:4<290::AID-DVG2>3.0.CO;2-4

KIM, G. D., LEE, J. H., SONG, S., ET AL. (2020): Generation of myostatin-knockout chickens mediated by D10A-Cas9 nickase. In: *FASEB*; 34: 5688–5696. p. DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.201903035R>

KIM, S. W., KO, Y-G., BYUN, M., DO, Y. J., HAN, J. Y., KIM, D. H., ET AL. (2013): Comparison of Vitrification and Slow Freezing for the Cryopreservation of Chicken Primordial Germ Cell (Ogye). In: *Journal of Animal Science and Technology*.;55:417-25. p.

KINO, K., PAIN, B., LEIBO, S. P., COCHRAN, M., CLARK, M. E., AND ETCHES, R. J. (1997): Production of Chicken Chimeras from Injection of Frozen-Thawed Blastodermal Cells. In: *Poult. Sci.* 76:753–760. p. DOI: 10.1093/ps/76.5.753

KINSKY, F.C. (1971): The consistent presence of paired ovaries in the Kiwi (*Apteryx*) with some discussion of this condition in other birds. In: *J Ornithol*, 112,334–357. p. DOI <https://doi.org/10.1007/BF01640692>:

KOHARA, Y., KANAI, Y., TAJIMA, A. (2008): Cryopreservation of Gonadal Germ Cells (GGCs) from the Domestic Chicken Using Vitrification. In: *The Journal of Poultry Science.*;45:57-61. p. DOI: <https://doi.org/10.2141/jpsa.45.57>

KONG, L., ET AL. (2018): Long-term in vitro culture and preliminary establishment of chicken primordial germ cell lines. In: *PLOS ONE*; 13(4): e0196459. p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196459>

KOSLOVÁ, A., TREFIL, P., MUCKSOVA', J., ET AL. (2020): Precise CRISPR/ Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. In: *Proc Natl Acad Sci USA*; 117: 2108–2112. p. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1913827117>

KURODA, Y., ARAI, N., ARITA, M., TERANISHI, M., HORI, T., HARATA, M., AND MIZUNO, S. (2001): Absence of Z-chromosome inactivation for five genes in male chickens. In: *Chromosome Research* 9, 457–468. p. DOI: [10.1023/A:1011672227256](https://doi.org/10.1023/A:1011672227256)

KÚTVÖLGYI, G., STEFLER, J., AND KOVÁCS, A. (2006): Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. In: *Biotech. Histochem.* 81, 109–117. p. DOI: <https://doi.org/10.1080/10520290600931007>

LAMBETH, L. S., MORRIS, K. R., WISE, T. G., CUMMINS, D. M., O'NEIL, T. E., CAO, Y., ET AL. (2016): Transgenic chickens overexpressing aromatase have high estrogen levels but maintain a predominantly male phenotype. In: *Endocrinology.*;157:83–90. p. DOI: <https://doi.org/10.1210/en.2015-1697>

LAVIAL, F., AND PAIN, B. (2010): Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model. In: *Dev. Growth Differ.* 52:101–114. p. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01152.x>

LÁZÁR, B., MOLNÁR, M., SZTÁN, N., VÉGI, B., DROBNYÁK, Á., TÓTH, R., TOKODYNÉ SZABADI, N., MCGREW, M. J., GÓCZA, E., PATAKINÉ VÁRKONYI, E. (2021): Successful cryopreservation and regeneration of a Partridge coloured Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. In: *Poultry Science* Volume 100, Issue 8, 101207. p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101207> D1 IF: 3.352

LEE, H. J., LEE, H. C., KIM, Y. M., HWANG, Y. S., PARK, Y. H., PARK, T. S., ET AL. (2016): Site-specific recombination in the chicken genome using Flipase recombinase-mediated cassette exchange. In: *FASEB J.*;30:555–63. p. DOI: [10.1096/fj.15-274712](https://doi.org/10.1096/fj.15-274712)

- LI, L., ZHANG, X., ZHAO, L., XIA, X., WANG, W. (2012): Comparison of DNA apoptosis in mouse and human blastocysts after vitrification and slow freezing. In: *Mol Reprod Dev.*;79:229-36. p. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.22018>
- LI, S., BAI, S., QIN, X., ZHANG, J., DAVID, M. IRWIN, ZHANG, S., WANG, Z. (2019): Comparison of whole embryonic development in the duck (*Anas platyrhynchos*) and goose (*Anser cygnoides*) with the chicken (*Gallus gallus*) In: *Poultry Science*, Volume 98, Issue 8, , 3278-3291. p. , ISSN 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pez133>.
- LI, T., MAI, Q., GAO, J., ZHOU, C. (2010): Cryopreservation of human embryonic stem cells with a new bulk vitrification method. In: *Biol Reprod.*;82:848-53. p. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080713>
- LI, Y., MCCLINTICK, J., ZHONG, L., EDENBERG, H. J., YODER, M. C., CHAN, R. J. (2005): Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. In: *Blood*, 105, 635–637. p. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2681
- LI, Y., TAN, J. C., LI, L. S. (2010): Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. In: *Fertility and sterility.*; 93:999-1005. p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.052>
- LI, Z. D., DENG, H., LIU, C. H., SONG, Y. H., SHA, J., WANG, N., WEI, H. (2002): Production of duck-chicken chimeras by transferring early blastodermal cells. In: *Poult Sci.* 2002 Sep;81(9):1360-4. p. DOI: 10.1093/ps/81.9.1360.
- LILLICO, S. G., SHERMAN, A, MCGREW, M. J., ROBERTSON, C. D., SMITH, J., HASLAM, C., ET AL. (2007): Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.*;104:1771–6. p. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0610401104>
- LIN, M., THORNE, M. H., MARTIN, I. C. A., SHELDON, B. L., AND JONES, R. C. (1995): Development of the gonads in the triploid (ZZW and ZZZ) fowl, *Gallus domesticus*, and comparison with normal diploid males (ZZ) and females (ZW). In: *Reproduction, Fertility and Development* 7, 1185–1197. p. DOI: 10.1071/RD9951185
- LIPTÓI, K. (2005): Embryonic development of goose during incubation In: *2nd Comb. Workshop on Fundamental Physiology and Perinatal Development* in Poultry Berlin, Németország 28. p.

LONG, J. S., IDOKO-AKOH, A., MISTRY, B., ET AL. (2019): Species-specific differences in use of ANP32 proteins by influenza A virus. In: *eLife* 2019; 8: e45066. p. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.45066>

LOVE, J., GRIBBIN, C., MATHER, C., SANG, H. (1994): Transgenic birds by DNA microinjection. In: *Biotechnology (N Y)*;12:60–3. p. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0194-60>

LU, Y., WEST, F. D., JORDAN, B. J., MUMAW, J. L., JORDAN, E. T., GALLEGOS-CARDENAS, A., BECKSTEAD, R. B., STICE, S. L. (2012): Avian-induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. In: *Stem Cells Dev.*, 21, 394–403. p. DOI: <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0499>

ŁUKASZEWICZ, E., LASOŃ, M., ROSENBERGER, J., KOWALCZYK, A., BAKST, M. (2017): Goose embryonic development from oviposition through 16 hours of incubation In: *Poult. Sci.* 1934-1938, 96 p DOI: 10.3382/ps/pew474

MACDONALD, J., GLOVER, J. D., TAYLOR, L., SANG, H. M., AND MCGREW, M. J. (2010): Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. In: *PLoS One* 5: e15518. p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015518>

MACDONALD, J., TAYLOR, L., SHERMAN, A., KAWAKAMI, K., TAKAHASHI, Y., SANG, H. M., ET AL. (2012): Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*;109:E1466–72. p. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1118715109>

MARZULLO, G. (1970): Production of chick chimaeras. In: *Nature* 225, 72–73. p. DOI: <https://doi.org/10.1038/225072a0>

MCCARTHY, EUGENE M. (2006): Handbook of avian hybrids of the world. Edition: 1st
Publisher: *Oxford University Press* Editor: Peter Prescott; Citations on Google Scholar:
<http://tinyurl.com/yd8rvw48> ISBN: 0-19-518323-1

MCGREW, M. J., SHERMAN, A., ELLARD, F. M., LILLICO, S. G., GILHOOLEY, H. J., KINGSMAN, A. J., ET AL. (2004): Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. In: *EMBO Rep.*;5:728–33. p. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400171>

MCQUEEN, H. A., AND CLINTON, M. (2009): Avian sex chromosomes: dosage compensation matters. In: *Chromosome Research* 17, 687–697. p. DOI: 10.1007/ s10577-009-9056-8

- MELAMED, E., AND ARNOLD, A. P. (2007): Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome. In: *Genome Biology* 8, R202. p. DOI: 10.1186/gb-2007-8-9-r202
- MENDEZ, C., CARRASCO, E., PEDERNERA, E. (2005): Adenohypophysis regulates cell proliferation in the gonads of the developing chick embryo. In: *J Exp Zool A Comp Exp Biol.*;303:179–85. p. DOI: <https://doi.org/10.1002/JEZ.A.141>
- MILLER, S. A., DYKES, D. D., AND POLESKY, H. F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In: *Nucleic Acids Res.* 16, 1215. p. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215
- MITSUMOTO, K. AND NISHIDA, S. (1958): Trials of production of the hybrid between quails and chickens. In: *J. Jap Zootech Sci* 29, 10. p.
- MIYAHARA, D., MORI, T., MAKINO, R., NAKAMURA, Y., OISHI, I., ONO, T., NIRASAWA, K., TAGAMI, T., AND KAGAMI, H. (2014): Culture Conditions for Maintain Propagation, Long-term Survival and Germline Transmission of Chicken Primordial Germ Cell-Like Cells. In: *J. Poult. Sci.* 51:87– 95. p. DOI: <https://doi.org/10.2141/jpsa.0130077>
- MIYAHARA, D., OISHI, I., MAKINO, R., KURUMISAWA, N., NAKAYA, R., ONO, T., KAGAMI, H., AND TAGAMI, T. (2016): Chicken stem cell factor enhances primordial germ cell proliferation cooperatively with fibroblast growth factor 2. In: *J. Reprod. Dev.* 62:143–149. p. DOI: 10.1262/jrd.2015-128
- MIZUARAI, S., ONO, K., YAMAGUCHI, K., NISHIJIMA, K., KAMIHIRA, M., IJIMA, S. (2001): Production of transgenic quails with high frequency of germ-line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector. In: *Biochem Biophys Res Commun.*;286:456–63. p. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5422

MOLNÁR, M., LÁZÁR, B., SZTÁN, N., VÉGI, B., DROBNYÁK, Á., TÓTH, R., LIPTÓI, K., MAROSÁN, M., GÓCZA, E., NANDI, S., MCGREW, M. J., VÁRKONYI, E. P. (2019): Investigation of the Guinea fowl and domestic fowl hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes In: *Sci. Rep.*, 1-13., 9 p. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50763-3>

MOORE, D. T., PURDY, P. H., BLACKBURN, H. D. (2006): A method for cryopreserving chicken primordial germ cells. In: *Poult Sci.*;85:1784-90. p. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/85.10.1784>

MTI (2020): <https://www.agroinform.hu/gazdasag/a-magyar-es-lengyel-libat-veszik-a-nemetek-karacsonyra-46652-001>

MUNRO, A. (1977): Mammalian Chimaeras . Anne McLaren . In: *Q. Rev. Biol.* 52:416–416. p.

NAGY, A., GÓCZA, E., DIAZ, E. M., PRIDEAUX, V. R., IVÁNYI, E., MARKKULA, M., ROSSANT, J. (1990): Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. In: *Development*. 1990 Nov;110(3):815-21. p. DOI: 10.1242/dev.110.3.815.

NAITO, M., NIRASAWA, K., AND OISHI, T. (1992): Preservation of quail blastoderm cells in liquid nitrogen. In: *Br. Poult. Sci.* 33:449–453. p. DOI: 10.1080/00071669208417482

NAITO, M., TAJIMA, A., TAGAMI, T., YASUDA, Y., KUWANA, T. (1994): Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. In: *J Reprod Fertil.*;102:321-5. p. DOI: 10.1530/jrf.0.1020321

NAKAJIMA, Y., MINEMATSU, T., NAITO, M., TAJIMA, A., (2011): A new method for isolating viable gonadal germ cells from 7-day-old chick embryos. In: *J Poult Sci*; 48: 106-111. p. DOI: <https://doi.org/10.2141/jpsa.010094>

NAKANISHI, A., IRITANI, A. (1993): Gene transfer in the chicken by sperm-mediated methods. In: *Mol Reprod Dev.*;36:258–61. DOI: 10.1002/mrd.1080360225

NAKAMURA, Y., YAMAMOTO, Y., USUI, F., MUSHIKA, T., ONO, T., SETIOKO, A. R., TAKEDA, K., NIRASAWA, K., KAGAMI, H., AND TAGAMI, T. (2007): Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. In: *Poult. Sci.* 86:2182–2193. p. DOI: 10.1093/ps/86.10.2182

- NAKAMURA, Y., USUI, F., MIYAHARA, D., MORI, T., ONO, T., TAKEDA, K., NIRASAWA, K., KAGAMI, H., TAGAMI, T. (2010a): Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken: concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujidori). In: *Reproduction, Fertility and Development* 22: 1237-1246. p. DOI: 10.1071/RD10056
- NAKAMURA, Y. ET AL. (2010b): Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. In: *Biol Reprod* 83, 130–7. p. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.083923>
- NAKAMURA, Y., USUI, F., MIYAHARA, D., MORI, T., WATANABE, H., ONO, T., ET AL. (2011): Viability and Functionality of Primordial Germ Cells after Freeze-thaw in Chickens. In: *The Journal of Poultry Science.*;48:57-63. p. DOI: <https://doi.org/10.2141/jpsa.010085>
- NAKAMURA, Y., TASAI, M., TAKEDA, K., NIRASAWA, K., TAGAMI, T. (2013): Production of functional gametes from cryopreserved primordial germ cells of the Japanese quail. In: *J Reprod Dev.*;59:580-7. p. DOI: 10.1262/jrd.2013-065
- NAKAMURA, Y. (2016): Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells. In: *J. Reprod. Dev.* 62, 2016–2052. DOI: 10.1262/jrd.2016-052
- NAKAO, K., NAKAGATA, N., KATSUKI, M. (1997): Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. In: *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science.*;46:231-4. p. DOI: <https://doi.org/10.1538/expanim.46.231>
- NANDI, S., WHYTE, J., TAYLOR, L., SHERMAN, A., NAIR, V., KAISER, P., ET AL. (2016): Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. In: *Poult Sci.* 95:1905–1911. p. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pew133>
- NIEUWKOOP, P.D. AND SUTASURYA, L.A. (1979): Primordial Germ Cells in the Chordates, Primordial Germ Cells in the Chordates : Embryogenesis and Phylogenesis, , Cambridge University Press, Developmental and Cell Biology Series, 187 p.
- NILSSON, E. E., AND J. G. CLOUD. (1992): Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:9425–9428. p. DOI: 10.1073/pnas.89.20.9425

- OISHI, I., YOSHII, K., MIYAHARA, D., ET AL. (2016): Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. In: *Sci Rep*; 6: 23980. p. DOI: 10.1038/srep23980
- OLSEN, L. C., AASLAND, R., FJOSE, A. (1997): A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. In: *Mech Dev*; 66:95–105. p. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(97\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(97)00099-3)
- OLSEN, M.W. AND NEHER, B.H. (1948): The site of fertilization in the domestic fowl. In: *J. of Exp. Zool.* 109: 355-366. p. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1401090303>
- OLSON, M. W. (1960): Turkey-chicken hybrids. In: *J Heredity.* 51, 69–73. p. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106955>
- ONO, T., MATSUMOTO, T., ARISAWA, Y. (1998): Production of donor-derived offspring by transfer of primordial germ cells in Japanese Quail. In: *Experimental Animals* 47: 215-219. p. DOI: 10.1538/expanim.47.215
- PAIN, B., CLARK, M. E., SHEN, M., NAKAZAWA, H., SAKURAI, M., ET AL. (1996): Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. In: *Development*; 122: 2339–48. p. DOI: 10.1242/dev.122.8.2339
- PANDA, S. K. AND MCGREW, M. J. (2021): Genome editing of avian species: implications for animal use and welfare. In: *Laboratory Animals*, Volume: 56 issue: 1, : 50-59. p. DOI: 10.1177/0023677221998400.
- PARK, H. J., PARK, T. S., KIM, T. M., KIM, J. N., SHIN, S. S., ET AL. (2006): Establishment of an in vitro culture system for chicken preblastodermal cells. In: *Mol Reprod Dev*; 73: 452–61. p. DOI: 10.1002/mrd.20441
- PARK, T. S., HAN, J. Y. (2012): piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 109:9337–41. p. DOI: 10.1073/pnas.1203823109
- PATAKINÉ VÁRKONYI, E., VÉGI, B., VÁRADI, É., LIPTÓI, K., BARNA, J. (2008): Embryonic cell manipulation of geese for gene preservation purposes. In: *World Poultry Science Journal* 64 (2): 552. p.

PATAKINÉ VÁRKONYI, E., VÉGI, B., VÁRADI, É., BARNA, J. (2010): Comparison of cryopreservation methods of blastodermal cells of various indigenous Hungarian poultry breeds. In: *World Poultry Science Journal* 66 (supplement): 485. p.

PATAKINÉ VÁRKONYI, E., HORVÁTH, G., SZTÁN, N., VÁRADI, É., BARNA, J. (2012): Vitrification of early avian blastodermal cells with a new type of cryocontainer. In: *Acta Veterinaria Hungarica* 60 (4): 501-509. p. DOI: 10.1556/AVet.2012.044

PATAKINÉ VÁRKONYI, E., MOLNÁR, M., SZTÁN, N., VÁRADI, É., VÉGI, B., PUSZTAI, P. (2016): Egy értékes hazai baromfifajtánk, a magyar parlagi gyöngytyúk (*Numida meleagris*) embrionális blasztoderma sejtjeinek mélyhűtése génmegőrzés céljából. In: *Magyar Állatorvosok Lapja* 138: 673-680. p.

PATAKINÉ VÁRKONYI, E., GÓCZA, E., LÁZÁR, B., SZTÁN, N. (2017): Mindkét ivar megőrzése embrionális sejtek segítségével különböző baromfifajokban. In: Szalay István (szerk.) *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében: Műhelytanulmányok a tudományos génmegőrzés tárgyköréből*. 214p. Budapest; Gödöllő: Haszonállat-génmegőrzési Központ, 2017, .113-122. p. (ISBN 978-963-286- 729-8)

PETITTE, J. N., CLARCK, M. E., LIU, G., VERRINDER GIBBINS, A. M., AND ETCHES, R. J. (1990): Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. In: *Development* 108:185–189. p. DOI: 10.1242/dev.108.1.185

PETITTE, J. N., BRAZOLOT C. L., CLARK, M. E., LIU, G., VERRINDER GIBBINS, A. M., ETCHES, R. J. (1993): Accessing the genome of the chicken using germline chimeras. In: *Manipulation of the Avian Genome*, R. J. Etches and A. M. Verrinder Gibbins eds. CRC press, Boca Raton, 81-101p

PETITTE, J. N., LIU, G. & YANG, Z. (2004): Avian pluripotent stem cells. In: *Mech. Dev.* 121, 1159–1168. p. DOI: 10.1016/j.mod.2004.05.003

PÉCZELY, P. (2013): Madár szaporodásbiológia. Agroinform kiadó, Budapest, 35-133. p.

REEDY, S. E., LEIBO, S. P., CLARK, M. E., AND ETCHES, R. J.. (1995): Beyond freezing semen . in *Proceedings First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. Bakst, M.R., Wishart, G.J., eds. *Poultry Science Association, Savoy, IL*. ,251–261. p.

REICZIGEL, J., HARNOS, A., AND SOLYMOSI, N. (2007): ‘Biostatistica.’ Pars Ltd.: Nagykovácsi, Hungary.

- REUBINOFF, B. E., PERA, M. F., VAJTA, G., TROUNSON, A. O. (2001): Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. In: *Human reproduction* (Oxford, England);16:2187-94. p. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/16.10.2187>
- REYNAUD, G. (1969): The transfer of turkey primordial germ cells to chick embryos by intravascular injection. In: *J Embryol Exp Morphol.* 21, 485–507. p. DOI: 10.1007/BF00848296
- RICHARDS, M., TAN, S., TAN, J. H., CHAN, W. K., BONGSO, A. (2004): The Transcriptome Profile of Human Embryonic Stem Cells as Defined by SAGE. In: *Stem Cells*, 22, 51–64. p. DOI: 10.1634/stemcells.22-1-51
- RIENZI, L., COBO, A., PAFFONI, A., SCARDUELLI, C., CAPALBO, A., VAJTA, G., ET AL. (2012): Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: an observational longitudinal cohort multicentric study. In: *Human reproduction* (Oxford, England);27:1606-12. p. DOI: 10.1093/humrep/des088
- RODDA, D.J., CHEW, J.-L., LIM, L.-H., LOH, Y.-H., WANG, B., NG, H.-H., ROBSON, P. (2005): Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. In: *J. Biol. Chem.*, 280, 24731–24737. p. DOI: 10.1074/jbc.M502573200
- ROSNER, M. H., VIGANO, M. A., OZATO, K., TIMMONS, P. M., POIRIE, F., RIGBY, P. W. J., STAUDT, L. M. (1990): A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. In: *Nat. Cell Biol.*, 345, 686–692. p. DOI: 10.1038/345686a0
- SALTER, D. W., SMITH, E. J., HUGHES, S. H., WRIGHT, S. E., FADLY, A. M., WITTER, R. L., ET AL. (1986): Gene insertion into the chicken germ line by retroviruses. In: *Poult Sci.*;65:1445–58. p. DOI: 10.3382/ps.0651445
- SCHUSSER, B., COLLARINI, E. J., YI, H., ET AL. (2013): Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. In: *Proc Natl Acad Sci USA*; 110: 20170–20175. p. DOI: 10.1073/pnas.1317106110
- SCOTT, B. B., LOIS, C. (2005): Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102:16443–7. p. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0508437102>

- SELLIER, N., BRILLARD, J. P., DUPUY, V., BAKST, M. R. (2006): Comparative staging of embryo development in chicken, turkey, duck, goose, guinea fowl, and Japanese quail assessed from five hours after fertilization through seventy-two hours of incubation. In: *Journal of Applied Poultry Research*, 15: 219-228. p. DOI: <https://doi.org/10.1093/japr/15.2.219>
- SETIOKO, A. R., TAGAMI, T., TASE, H., NAKAMURA, Y., TAKEDA, K., NIRASAWA, K. (2007): Cryopreservation of Primordial Germ Cells (PGCs) from White Leghorn Embryos Using Commercial Cryoprotectants. In: *The Journal of Poultry Science*.,44:73-7. p. DOI: <https://doi.org/10.2141/jpsa.44.73>
- SHIN, S. S., KIM, T. M., KIM, S. Y., KIM, T. W., SEO, H. W., LEE, S. K., ET AL. (2008): Generation of transgenic quail through germ cell-mediated germline transmission. In: *FASEB J.*;22:2435–44. p. DOI: 10.1096/fj.07-101485
- SILVA, J., CHAMBERS, I., POLLARD, S., SMITH, A. (2006): Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. In: *Nat. Cell Biol.*, 441, 997–1001. p. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04914>
- SMIRNOV, A. F., AND TRUKHINA, A. V. (2019): Comparison of Sex Determination in Vertebrates (Nonmammals). In Y.-C. Chen & S.-J. Chen (Eds.), In: *Gene Expression and Phenotypic Traits*. IntechOpen. London. 10.5772/intechopen. 83831. p. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.83831>
- SMITH, C. A., AND SINCLAIR, A. H. (2004): Sex determination: insights from the chicken. In: *BioEssays* 26, 120–132. p. DOI:10.1002/bies.10400
- SMITH, C. A., ROESZLER, K. N., OHNESORG, T., CUMMINS, D. M., FARLIE, P. G., DORAN, T. J., AND SINCLAIR, A. H. (2009): The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. In: *Nature* 461, 267–271. p DOI: 10.1038/nature08298
- SMITH, G. D., SERAFINI, P. C., FIORAVANTI, J., YADID, I., COSLOVSKY, M., HASSUN, P., ET AL. (2010): Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. In: *Fertility and sterility*.;94:2088-95. p. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.065
- SPEMANN, H. (1903): “Ueber Linsenbildung nach experimenteller Entfernung der primären Linsenbildungszellen,” In: *Anat. Anzeiger*,28., 432. p.

SPRATT, N. T., HAAS, H. (1961): Integrative mechanisms in development of the early chick blastoderm. III. Role of cell population size and growth potentiality in synthetic systems larger than normal. In: *J. Exp. Zool.* 147, 271–293. p. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1401470308>

SWIFT, C. H. (1914): Origin and early history of the primordial germ-cells in the chick. In: *Am J Anat.*;15:483–516.p. DOI: <https://doi.org/10.1002/aja.1000150404>

SZALAY, I. (2015): Régi magyar baromfifajták a XXI. században.. 49-51, 117-122. p. Mezőgazda Kiadó

SZTÁN, N., PATAKINÉ VÁRKONYI, E., LIPTÓI, K., BARNA, J. (2012): Baromfifajok embrionális sejtjeinek kezelésével szerzett tapasztalatok. In: *Magyar Állatorvosok Lapja* 134 (8): 475-481. p.

TAGAMI, T., MIYAHARA, D., NAKAMURA, Y. (2017): Avian primordial germ cells. In: *Adv Exp Med Biol.*;1001:1–18. p. DOI: 10.1007/978-981-10-3975-1_1

TAJIMA, A., GRAHAM, E. F., SHOFFNER, R. N., OTIS, J. S., AND HAWKINS, D. M. (1990): Cryopreservation of semen from unique lines of chicken germ plasm. In: *Poult. Sci.* 69:999–1002. p. DOI: 10.3382/ps.0690999

TAJIMA, A., NAITO, M., YASUDA, Y., KUWANA, T. (1993): Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*) In: *Theriogenology* 40: 509-519. p. DOI: 10.1016/0093-691x(93)90404-s

TAJIMA, A., NAITO, M., YASUDA, Y., KUWANA, T. (1998): Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. In: *J Exp Zool.*; 280:265-7. p. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980215\)280:3<265::AID-JEZ8>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980215)280:3<265::AID-JEZ8>3.0.CO;2-L)

TAJIMA, A., HAYASHI, H., KAMIZUMI, A., OGURA, J., KUWANA, T., AND CHIKAMUNE, T.. (1999): Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. In: *J. Exp. Zool.* 284:759–764. p. DOI: 10.1002/(sici)1097-010x(19991201)284:7<759::aid-jez5>3.0.co;2-6

TAKAHASHI, K., YAMANAKA, S. (2006): Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. In: *Cell*, 126, 663–676. p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

- TAYLOR, L., CARLSON, D. F., NANDI, S., ET AL. (2017): Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. In: *Dev Camb Engl*; 144: 928–934. p. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.145367>
- THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., ET AL. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. In: *Science*; 282: 1145–7. p. DOI: [10.1126/science.282.5391.1145](https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145)
- THORAVAL, P., LASSERRE, F., COUDERT, F. AND DAMBRINE, G. (1994): Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white leghorns by transfer of early blastodermal cells. In: *Poult Sci.* 73, 1897–905. p. DOI: [10.3382/ps.0731897](https://doi.org/10.3382/ps.0731897)
- THORAVAL, P., AFANASSIEFF, M., COSSET, F. L., LASSERRE, F., VERDIER, G., COUDERT, F., AND DAMBRINE, G. (1995): Germline transmission of exogenous genes in chickens using helper-free ecotropic avian leukosis virus-based vectors. In: *Transgenic Res.* 4:369–377. p. DOI: [10.1007/BF01973755](https://doi.org/10.1007/BF01973755)
- THORNE, M. H. (1995): Genetics of poultry reproduction. In: *Poultry Production* (Ed. P. Hunton.). 411–434. p. (Elsevier: Amsterdam.)
- THORNE, M. H., NICHOLAS, F. W., MORAN, C., AND SHELDON, B. L. (1997): Genetic analysis of triploidy in a selected line of chickens. In: *Journal of Heredity* 88, 495–498. p. DOI: [10.1093/oxfordjournals.jhered.a023143](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023143)
- TONUS, C., CLOQUETTE, K., ECTORS, F., PIRET, J., GILLET, L., ANTOINE, N., DECMECHT, D., VANDERPLASSCHEN, A., WAROUX, O., GROBET, L. (2016): Long-term cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. In: *Reproduction, Fertility and Development* 28: 628-639. p. DOI: [10.1071/RD14194](https://doi.org/10.1071/RD14194)
- TSUNEKAWA, N., NAITO, M., SAKAI, Y., ET AL. (2000): Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. In: *Development.*;127:2741–50. p. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.127.12.2741>
- TUBARO, P. L. AND LIJTMAER, D. A. (2002): Hybridization patterns and the evolution of reproductive isolation in ducks. In: *Biol J Linn Soc.* 77, 193–200. p. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00096.x>

TYACK, S. G., JENKINS, K. A., O'NEIL, T. E., WISE, T. G., MORRIS, K. R., BRUCE, M. P., ET AL. (2013): A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. In: *Transgenic Res.*;22:1257–64. p. DOI: 10.1007/s11248-013-9727-2

VAN DE LAVOIR, M.-C, MATHER-LOVE, C., LEIGHTON, P., DIAMOND, J. H., HEYER, B. S., ET AL. (2006): High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells. In: *Mech Dev*; 123: 31–41. p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.10.002>

VAN DE LAVOIR, M.-C., DIAMOND, J. H., LEIGHTON, P. A., MATHER-LOVE, C., HEYER, B. S., BRADSHAW, R., ... ETCHES, R. J. (2006b): Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. In: *Nature*, 441(7094), 766–769. p. DOI:10.1038/nature04831

VANDERZWALMEN, P., ECTORS, F., GROBET, L., PRAPAS, Y., PANAGIOTIDIS, Y., VANDERZWALMEN, S., ET AL. (2009): Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVF. In: *Reproductive biomedicine online.*;19:700-7. p. DOI: 10.1016/j.rbmo.2009.09.011

VANDERZWALMEN, P., ZECH, N. H., ECTORS, F., STECHER, A., LEJEUNE, B., VANDERZWALMEN, S., ET AL. (2012): Blastocyst transfer after aseptic vitrification of zygotes: an approach to overcome an impaired uterine environment. In: *Reproductive biomedicine online.*;25:591-9. p. DOI: 10.1016/j.rbmo.2012.09.004

VENKATARAMA, T., LAI, F., LUO, X., ET AL. (2010): Repression of zygotic gene expression in the *Xenopus* germline. In: *Development.*;137:651–60. p. DOI: 10.1242/dev.038554

VICK, L., LI, Y., SIMKISS, K. (1993): Transgenic birds from transformed primordial germ cells. In: *Proc Biol Sci.*;251:179–82. p. DOI: 10.1098/rspb.1993.0026

WALDEYER, W. (1870): Eierstock und Ei. Ein Beitrag zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Sexualorgane. Leipzig: W. Engelmann;

WANG, L., M. J. CHEN, D. Y. CHEN, S. F. PENG, X. L. ZHOU, Y. Y. LIAO, X. G. YANG, H. Y. XU, S. S. LU, M. ZHANG, K. H. LU, AND Y. Q. LU. (2017): Derivation and characterization of primordial germ cells from Guangxi yellow-feather chickens. In: *Poult. Sci.* 96:1419–1425. p. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pew387>

WARREN, D. C. AND SCOTT, H. M. (1935): An attempt to produce turkey-chicken hybrids. In: *J Heredity.* 26, 105–7. p. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a104040>

- WHYTE, J., GLOVER, J. D., WOODCOCK, M., BRZESZCZYNSKA, J., TAYLOR, L., SHERMAN, A., KAISER, P., MCGREW, M. J. (2015): FGF, insulin, and SMAD signaling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal. In: *Stem Cell Reports* 5:1171-1182. p. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.10.008
- WILCOX, F. H. & CLARK, O. E. (1961): Chicken-quail hybrids. In: *J Heredity*. 52, 167–70. p. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107057>
- WOLFNÉ TÁSKAI, E. (2000): A madarak szaporodási folyamatai. In: *Dr. Husvéth, F. Szerk. A háziállatok élettana és anatómiája*. 592-607. p.
- WOODCOCK, M. E., GHEYAS, A. A., MASON, A. S., ET AL. (2019): Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. In: *Proc Natl Acad Sci USA*; 116: 20930–20937. p. DOI: 10.1073/pnas.1906316116
- YAKHKESHI, S., RAHIMI, S., SHARAFI, M., HASSANI, S. N., TALEAHMAD, S., SHAHVERDI, A., BAHARVAND, H. (2018): In vitro improvement of quail primordial germ cell expansion through activation of TGF-beta signaling pathway. In: *J Cell Biochem* 119:4309–4319. p. DOI: 10.1002/jcb.26618
- YASUDA, Y., TAJIMA, A., FUJIMOTO, T., KUWANA, T. (1992): A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. In: *Journal of Reproduction and Fertility* 6: 521-528. p. DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960521>
- YUAN, X., ZHANG, C., ZHAO, R., JIANG, J., SHI, X., ZHANG, M., SUN, H., ZUO, Q., ZHANG, Y., SONG, J., ET AL. (2021): Glycolysis Combined with Core Pluripotency Factors to Promote the FORMATION of Chicken Induced Pluripotent Stem Cells. In: *Animals*, 11, 425. p. DOI: 10.3390/ani11020425
- ZHANG, S. O., MATHUR, S., HATTEM, G., TASSY, O., AND POURQUIE, O. (2010): Sexdimorphic gene expression and ineffective dosage compensation of Z-linked genes in gastrulating chicken embryos. In: *BMC Genomics* 11, 13. p. DOI:10.1186/1471-2164-11-13
- ZHANG, Z., SUN, P., YU, F., YAN, L., YUAN, F., ZHANG, W., ET AL. (2012): Transgenic quail production by microinjection of lentiviral vector into the early embryo blood vessels. In: *PLoS One*.;7:e50817. p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050817>

ZHAO, D., MCBRIDE, D., NANDI, S., MCQUEEN, H. A., MCGREW, M. J., HOCKING, P. M., LEWIS, P. D., SANG, H. M., AND CLINTON, M. (2010): Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. In: *Nature* 464, 237–242. p. DOI:10.1038/nature08852

ZHAO, R. (2019): Establishment the System of Chicken CEF Reprogramming Induce to PGC and Research of its Migration Homing Fuction. Master's Thesis, Yangzhou University, Yangzhou, China

ZHOU, H., LAMONT, S. J. (1999): Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. In: *Anim Genet* 30:256–264 p. DOI: 10.1046/j.1365-2052.1999.00505.x

IUCN Red List version 2020-1: Table 4a, <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics#Summary%20Tables>

NAK – Nemzeti Agrárgazdasági Kamara, (2019) november 8.: <https://www.agroinform.hu/allattenyesztes/nyomott-arakkal-kuzd-a-ludagazat-41780-001>

AGROINFORM (2020) november 24: <https://www.agroinform.hu/allattenyesztes/koronavirus-jelentosen-csokkent-a-kacsa-es-libatermekek-kereslete-46451-001>

11.2. M2. A KISÓZÁSOS DNS IZOLÁLÁS SORÁN HASZNÁLT PUFFEREK ÖSSZETÉTELE

Sejt lízis puffer összetétele	
0,15M NH ₄ Cl	} pH 7,4
0,01M KHCO ₃	
1mM EDTA (pH 8)	

1.melléklet: A sejt lízis puffer összetétele

Sejtmag lízis puffer összetétele	
1M Tris-HCl	} pH 8,2
0.4M NaCl	
1mM EDTA (pH 8)	

2.melléklet: A sejtmag lízis puffer összetétele

11.3. M3. A MIKROSZATELLIT MARKER ALAPJÁN TÖRTÉNŐ DONOR/RECIPIENS KIVÁLASZTÁS ÉS KIMÉRA AZONOSÍTÁS PCR REAKCIÓK PARAMÉTEREI

Bca μ 3 PCR reakció paraméterei		
hőmérséklet	idő	ismétlés
95 °C	4 perc	1 x
95 °C	15 mp	} 30 x
60 °C	30 mp	
72 °C	1 perc	
72 °C	9 perc	1 x

3. Melléklet: A PCR reakció paraméterei

Bca μ 3 PCR reakció összetétele	1 mintára
Desztillált víz	4,9 μ l
10x DreamTaq Puffer (20 mM MgCl ₂)	1,5 μ l
Bca μ 3 forward primer (5 μ M)	1 μ l
Bca μ 3 reverse primer (5 μ M)	1 μ l
Nukleotid (25mM)	1,5 μ l
DreamTaq DNS polimeráz enzim (5U/ μ l)	0,1 μ l
DNS mennyisége (5 ng/l)	5 μ l

4. melléklet: A Bca μ 3 PCR reakció összetétele 15 μ l reakcióelegyben

11.4. M4. LÚD EMBRIÓFEJLŐDÉSI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

HH stádium ->	≤ HH10	HH 10	HH 11	HH 12	HH 13	HH 14	HH 15	HH 16	HH 17	HH 18	HH 19	HH 20	HH 21	HH 22	HH22<	embriók száma az inkubálási idő függvényében
inkubálási idő (óra)																
60	2	1	2	2	7	1	1	1								17
61	2	1	1	2	7	3	2									18
62	1	1	2	2	5	7	2	1								21
63	2	1	1	1	5	8	3	1	1							23
64	8	3	5	4	1	1										22
65	1		1		5	10	4	1	1							23
66		2	1	1	5	5	2	1								17
67	3	1	1	2	3	4	1	2		1						18
68	1				4	7	5	2	1							20
69	2		1		3	11	1		1							19
70	3		2	1	3	2	4		3							18
71	6		1	1		7	5	4	3							27
72					1	4	3	4	3	1						16
73			2		1	11	13	14	7	1						49
74					2	15	15	19	7	3		2				63
75					3	11	15	22	12	4						67
76		2			2	2	6	14	7	4	2					39
77	2		2	1	1	3	4	1	5							19
78	1		1	2	1		5	5	2	3	1	1				22
79							6	9	7	4						26
80							1	1	5	7	4		1		1	20
81						1	2	2	3	4	3					15
82						1	1	3	5	7	2	1				20
83							3	7	7	4	1					22
84		1	2	1	1	1	1	7	8	1						23
85		1	2		1	2	1	3	4	2	1				1	18
86					1		1	5	8	3		2				20
87						2		3	9	1	1					16
88					1	1	2	2	5	7	1	3	1	1	1	25
89					1		1		7	5	2	3	1		2	22
embriók száma a fejlődési stádium függvényében	34	14	27	20	64	120	110	134	121	62	18	12	3	1	5	összesen:745

5. melléklet: lúd embriófejlődési vizsgálatok részletes adatai

12. FONTOSABB TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés témakörében megjelent impakt faktoros tudományos szakcikkek:

- **Sztán, N.**, Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Barna, J. (2012): Baromfifajok embrionális sejtjeinek kezelésével szerzett tapasztalatok/Observations of embryonic cell manipulations in different poultry species **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA**:(8) pp. 475-481. (2012) **Q3 IF: 0.108**
- Patakiné Várkonyi, E., Horváth, G., **Sztán, N.**, Váradi, É., Barna, J. (2012): Vitrification of Early Avian Blastodermal Cells with a New Type of Cryocontainer **ACTA VETERINARIA HUNGARICA** 60: (4) pp. 501-509. <https://doi.org/10.1556/avet.2012.044> **Q2 IF: 1.202**
- Patakiné Várkonyi, E., Molnár, M., **Sztán, N.**, Váradi, É., Végi, B., Pusztai, P. (2016): Egy értékes hazai baromfifajtánk, a magyar parlagi gyöngytyúk (*Numida meleagris*) embrionális blastodermasejtjeinek mélyhűtése génmegőrzés céljából: Cryopreservation of embryonic blastodermal cells of a valuable domestic poultry breed, the Hungarian landrace guinea fowl (*Numida meleagris*) as a biodiversity preservation method **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA** 138/11: pp. 673-680. **Q4 IF: 0.031**
- **Sztán, N.**, Lázár, B., Bodzsár, N., Végi, B., Liptói, K., Pain, B., Patakiné Várkonyi, E. (2017): Successful chimera production in the Hungarian goose (*Anser anser domestica*) by intracardiac injection of blastodermal cells in 3-day-old embryos. **REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT**. doi: 10.1071/RD16289. **Q1, IF: 2.656**
- Molnár, M., Lázár, B., **Sztán, N.**, Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Liptói, K., Marosán, M., Gócza, E., Nandi, S., McGrew, M. J., Patakiné Várkonyi, E. (2019): Investigation of the Guinea fowl and domestic fowl hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes. **SCIENTIFIC REPORT**, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50763-3>. **D1, IF:4.585**
- Lázár, B., Molnár, M., **Sztán, N.**, Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Tokodyné Szabadi, N., McGrew, M. J., Gócza, E., Patakiné Várkonyi, E. (2021): Successful cryopreservation and regeneration of a Partridge coloured Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. **POULTRY SCIENCE** <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101207> **D1 IF: 3.352**

Az értekezés témájában íródott könyvfejezet:

- Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E., Lázár, B., **Sztán, N.**, (2017): **Mindkét ivar megőrzése embrionális sejtek segítségével különböző baromfifajokban.** In: Szalay István (szerk.) Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében: Műhelytanulmányok a tudományos génmegőrzés tárgyköréből. 214p. Budapest; Gödöllő: Haszonállat-génmegőrzési Központ, 2017, pp.113-122. (ISBN 978-963-286-729-8)

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megragadni az alkalmat, hogy megköszönjem elsősorban témavezetőimnek, **Dr. Várkonyi Eszternek** és **Dr. Hidas Andrásnak** a támogatást, a munkám során nyújtott segítséget. Köszönöm, hogy hatásukra és segítségükkel kezdhettem el PhD tanulmányaimat. Andrásnak köszönöm a motivációt a nehéz időszakokban, és az értékes meglátásait. Eszternek hálával tartozom, hogy mindig hitt bennem, támogatott és rengeteget segített kutatómunkám és dolgozatom létrejöttében is, nélküle ma nem az lennék, aki vagyok, és nem tartanék ott, ahol tartok.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Liptói Krisztinának** az NBGK-HGI kutatási igazgatóhelyettesének, valamint a Genetika- és Szaporodásbiológia Kutatócsoport minden munkatársának a szakmai és gyakran baráti segítségért, támogatásért. Külön köszönöm **Dr. Lázár Bencének**, **Dr. Pálincás-Bodzsár Nórának**, **Molnár Mariannak**, **Dr. Barna Juditnak**, **Végi Barbarának**, **Kissné Dr. Váradí Évának**, **Edviné Meleg Erikának** és **Lipcsei Józsefnének** a rengeteg munkát és támogatást, mellyel a kutatás különböző munkafolyamatai során segítségemre voltak.

Hálás vagyok a munkám során nyújtott segítségért a MATE-MBK Alkalmazott Embriológia és Őssejt kutatócsoport vezetőjének, **Dr. Góczy Elennek**, és minden munkatársának, közülük is kiemelve **Tóth Rolandot**, aki munkám során rengeteget segített mind az embriók vizsgálata, mind az injekciós kísérleteim során.

Embriófejlődési vizsgálataim során nyújtott segítségéért és számtalan hasznos ötletéért köszönet illeti **Dr. Nagy Nándort** és kutatócsoportját, elsősorban **Pecsenye-Fejszák Nórát** (Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet), aki hatalmas segítséget nyújtott az embriófejlődési vizsgálataim során, rengeteget tanulhattam tőle is.

Végül, de nem utolsó sorban hálával és köszönettel tartozom **családomnak** és **barátaimnak**. Édesanyámnak, édesapámnak, a testvéreimnek, és a kislányomnak, hogy mindvégig mellettem álltak és támogattak, elviseltek ezen az igen hosszú úton, nélkülük nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.